



Raquel Alexandra Cardoso Pires

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e
Bioquímica

**Preparação e caracterização de micropartículas de
polissacarídeos produzidas por secagem por atomização
para libertação controlada de fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Margarida Cardoso, FCT-UNL

Co-orientadores: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, ISA-ULisboa

Júri:

Presidente: Doutora Susana Filipe Barreiros

Arguente: Doutora Isabel Maria Rola Coelho



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2015

Raquel Alexandra Cardoso Pires

Licenciada em Ciências de Engenharia Química e Bioquímica

**Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas
por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Doutora Margarida Cardoso, FCT-UNL

Co-orientador: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, ISA-ULisboa

Júri:

Presidente: Doutora Susana Filipe Barreiros

Aguente: Doutora Isabel Maria Rola Coelho

Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por *spray-drying* para libertação controlada de fármacos

Copyright © Raquel Alexandra Cardoso Pires, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

No decorrer dester trabalho, existiram obstáculos que, directa ou indirectamente, afectaram este trabalho. Como tal, quero demonstrar o meu agradecimento às seguintes pessoas, que contribuíram para ultrapassá-los de alguma maneira:

À Doutora Margarida Cardoso, pela paciência e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Vitor Alves, por todos os conhecimentos que me transmitiu e pela ajuda no desenvolvimento experimental.

À Doutora Filomena Freitas, pela disponibilidade para a produção do polissacárido extracelular, assim como toda a informação disponibilizada.

À Dona Maria José e à Dona Palminha, pela disponibilidade e prontidão em ajudar.

À Cláudia, por todo o apoio, conselhos e conhecimentos partilhados.

A todos os amigos, dentro e fora da faculdade, que de alguma maneira contribuíram para alegrar os meus dias no decorrer de todo o curso.

À família Silva, por todo o apoio e carinho.

À minha família, especialmente ao meu pai, António Pires, pela compreensão, pelo apoio incansável, pelos recursos que me disponibilizou, e por todo o esforço feito para que esta etapa da minha vida chegasse ao fim, e à minha irmã, Maria Pires, por todas as gargalhadas, por me “chatear” todos os dias e contribuir com momentos especiais na minha vida.

Por fim, ao Rodolfo Silva, presente em todos os momentos, revelando extrema paciência, compreensão, apoio, amizade, carinho e mostrando-se incansável em todos os momentos que a sua atenção era necessária.

Um grande obrigado a todos!

RESUMO

Neste trabalho foram produzidas micropartículas de polissacarídeos contendo um fármaco anticancerígeno, o 5-Fluorouracil, ou um anti-inflamatório, a Prednisolona, utilizando como matrizes encapsulantes o quitosano e o FucoPol. As micropartículas foram produzidas pelo método de secagem por atomização (*spray-drying*). Foram estudados vários reticulantes biocompatíveis: o ácido glutâmico; o ácido cítrico e a lisina.

As micropartículas produzidas foram caracterizadas em termos de morfologia, tamanho, propriedades químicas, propriedades térmicas, cristalinidade e eficiência de encapsulamento recorrendo a técnicas como microscopia electrónica de varrimento (SEM), Espectro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), difracção de raios-X (XRD) e espectroscopia UV.

Os perfis de concentração foram obtidos realizando ensaios de libertação em dois meios distintos, em Suco Gástrico Simulado (pH=1,2) e Suco Intestinal Simulado (pH=6,8) e foram calculadas as velocidades de libertação para cada ensaio. Verificou-se que os ensaios com o fármaco modelo Prednisolona em matrizes de quitosano em meio ácido, pH=1,2, apresentam uma libertação mais lenta.

Os reticulantes mais adequados para o quitosano são o ácido glutâmico para a libertação no estômago, a pH=1,2, e o ácido cítrico para a libertação no intestino, a pH=6,8. Em relação ao FucoPol, a concentração de reticulante mais adequada para ambos os meios de libertação revelou ser a de 50% em massa de lisina relativamente à massa de FucoPol.

Palavras-Chave: Libertação controlada, 5-Fluorouracil, Prednisolona, Quitosano, FucoPol, Microencapsulação, *Spray-drying*.

ABSTRACT

In this dissertation polysaccharide microparticles containing an anticancer drug, 5-Fluorouracil, or an anti-inflammatory, Prednisolone, were produced using different encapsulating matrices, chitosan and FucoPol. In order to modify the release of the drugs from the different matrices, biocompatible crosslinkers were implemented, such as glutamic acid, citric acid and lysine. When implementing the studies with the lysine, it was also studied the effect of the concentration of the crosslinker on the particle characteristics and release properties.

The produced microparticles were characterized by their morphology, size, chemical properties, thermal properties, crystallinity and encapsulation efficiency using techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared spectrum by Fourier Transform (FT-IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-Ray Diffraction (XRD) and UV spectroscopy.

The concentration profiles were obtained by performing release assays in two different solutions, in Simulated Gastric Fluid (pH = 1.2) and in Simulated Intestinal Fluid (pH = 6.8), which respective release rates for each assay were calculated. It was verified among the tests that when the model drug Prednisolone when implemented using a chitosan matrix in acidic solution (pH = 1.2) exhibited a slower release.

Among the results, while using chitosan matrices, the glutamic acid showed to be the most suitable crosslinking agent for stomach releases at pH=1.2 and the citric acid the best crosslinking agent for intestinal releases at pH=6.8. Regarding the FucoPol matrix, it was verified that the best concentration of the crosslinker for both kinds of release is when the lysine is present in the matrix in a ratio of 50% of the FucoPol mass.

Keywords: Controlled release, 5-Fluorouracil, Prednisolone, Chitosan, FucoPol, Microencapsulation, Spray drying.

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice	XI
Índice de Figuras	XVII
Índice de Tabelas	XXI
Abreviaturas	XXIII
1. Introdução	1
1.1. Objectivos	2
1.2. Libertação controlada	3
1.2.1. Mecanismos de libertação	7
1.2.2. Modelos cinéticos	8
1.3. Microencapsulação	10
1.3.1. Classificação de micropartículas com compostos encapsulados	12
1.3.2. Técnicas de microencapsulação	12
1.4. Matrizes de base polimérica	15
1.4.1. Quitosano	17
1.4.2. Polissacárido extracelular, FucoPol	18
1.5. Reticulação	19
1.6. Fármacos modelo	22

1.6.1. 5-Fluorouracil	23
1.6.2. Prednisolona	24
2. Materiais e métodos	27
2.1. Materiais	29
2.2. Métodos	29
2.2.1. Produção de FucoPol	29
2.2.2. Preparação de micropartículas	30
2.2.3. Caracterização das micropartículas	33
2.2.4. Ensaios de Liberação	35
3. Resultados e discussão	37
3.1. Caracterização das micropartículas de quitosano	39
3.1.1. Morfologia e tamanho	39
3.1.2. Propriedades químicas	44
3.1.3. Propriedades térmicas e cristalinidade	47
3.1.4. Eficiência de encapsulação e carregamento de fármaco	50
3.2. Caracterização das micropartículas de FucoPol	51
3.2.1. Morfologia e tamanho	51
3.2.2. Propriedades químicas	56
3.2.3. Propriedades térmicas e cristalinidade	58
3.2.4. Eficiência de encapsulação e carregamento de fármaco	61
3.3. Ensaios de Liberação <i>In vitro</i>	62
3.3.1. Liberação a partir de partículas de quitosano	62

3.3.2. Libertação a partir de partículas de FucoPol	66
3.4. Modelos cinéticos	70
4. Conclusões	73
5. Trabalho Futuro	78
6. Bibliografia	81
7. Anexos	88

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Gráfico da concentração de fármaco em função do tempo para dose única e múltipla, adaptado de [1].	5
Figura 1.2 - Gráfico da concentração de fármaco em função do tempo para diferentes sistemas de libertação, adaptado de[1].	6
Figura 1.3 - Número cumulativo de artigos publicados sobre microencapsulação e microencapsulação por <i>spray-drying</i> desde 1974. [8]	11
Figura 1.4 - Esquema do processo de microencapsulação por <i>spray-drying</i>	14
Figura 1.5 - Estrutura química do quitosano ($n > 60$)[2]	18
Figura 1.6 - Estrutura química do ácido cítrico[27]	21
Figura 1.7 - Interação entre o ácido cítrico e o quitosano [28]	21
Figura 1.8 - Estrutura química do ácido glutâmico[29]	21
Figura 1.9 - Estrutura química da L-Lisina [29]	22
Figura 1.10 - Diagrama do ciclo celular [36]	23
Figura 1.11 - Estrutura química do 5FU[37]	24
Figura 1.12 - Estrutura química da Prednisolona[42]	24
Figura 3.1 - Fotografias de micropartículas de quitosano com 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x	39
Figura 3.2 - Micropartículas de a) Q+AC, ampliação 1000x; b) Q+AG, ampliação 5500x.	39
Figura 3.3 - Fotografias de micropartículas de quitosano com ácido glutâmico e 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x	40
Figura 3.4 - Fotografias de micropartículas de quitosano com ácido cítrico e 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x.	40

Figura 3.5 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+5FU	41
Figura 3.6 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+AG+5FU	42
Figura 3.7 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+AC+5FU	42
Figura 3.8 - Fotografia de micropartículas de quitosano com Prednisolona: a) Prednisolona em suspensão; b) Prednisolona solubilizada em etanol. Ampliação 5500x	43
Figura 3.9 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+P	43
Figura 3.10 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+5FU, do quitosano e do 5FU	45
Figura 3.11 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+AG+5FU, do quitosano, do AG e do 5FU	45
Figura 3.12 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+AC+5FU, do quitosano, do AC e do 5FU	46
Figura 3.13 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+P, do quitosano e da Prednisolona.	47
Figura 3.14 - Espectro XRD do Quitosano	48
Figura 3.15 - Espectro XRD do 5FU	48
Figura 3.16 - Espectro XRD das micropartículas de Q+AG+5FU	49
Figura 3.17 - DSC de quitosano, AG, 5FU e micropartículas de Q+AG+5FU	49
Figura 3.18 - Fotografia de micropartícula de FucoPol. Ampliação: a)1000x; b)5500x	51
Figura 3.19 - Fotografia de micropartícula de FucoPol com 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x	52
Figura 3.20 - Fotografia de micropartícula de FucoPol com lisina(50) e 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x	52
Figura 3.21 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+5FU	53
Figura 3.22 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+Lis50+5FU	53
Figura 3.23 - Micropartícula de EPS com Prednisolona. Ampliação: a)1000x; b) 5500x	54

Figura 3.24 - Micropartícula de EPS com lisina(50) e Prednisolona. Ampliação: a)1000x; b)5500x	54
Figura 3.25 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+P	54
Figura 3.26 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+Lis50+P	55
Figura 3.27 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+5FU, do EPS e do 5FU.	56
Figura 3.28 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+Lis50+5FU, do EPS, da Lis e do 5FU.	57
Figura 3.29 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+P, do EPS e da Prednisolona.	58
Figura 3.30 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+Lis50+P, do EPS, da Lis e da Prednisolona.	58
Figura 3.31 - Espectro XRD das micropartículas de EPS, EPS+Lis50, EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis50+P	59
Figura 3.32 - DSC de EPS, Lis, 5FU e micropartículas de EPS+Lis+5FU	60
Figura 3.33 - DSC de EPS, Lis, Prednisolona e micropartículas de EPS+Lis+P	61
Figura 3.34 - Perfis de liberação de micropartículas de Q+5FU, Q+AG+5FU, Q+AC+5FU a pH=1,2	62
Figura 3.35 - Perfis de liberação de micropartículas de Q+5FU, Q+AG+5FU, Q+AC+5FU a pH=6,8	63
Figura 3.36 - Perfil de liberação das micropartículas de Q+P a pH=1,2 e pH=6,8.	64
Figura 3.37 - Perfis de liberação de micropartículas de EPS+5FU, EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis75+5FU a pH=1,2	66
Figura 3.38 - Perfis de liberação de micropartículas de EPS+5FU, EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis75+5FU a pH=6,8	67
Figura 3.39 - Perfis de liberação de micropartículas de EPS+P, EPS+Lis50+P e EPS+Lis75+P a pH=1,2	69

Figura 3.40 - Perfis de liberação de micropartículas de EPS+P, EPS+Lis50+P e EPS+Lis75+P a pH=6,8	69
Figura 3.41 - Modelação cinética do perfil de liberação de EPS+Lis50+5FU a pH=6,8	71
Figura 3.42 - Modelação cinética do perfil de liberação de EPS+Lis50+P a pH=6,8	71
Figura 0.1 - Espectro XRD do ácido glutâmico	90
Figura 0.2 - DSC do quitosano	92
Figura 0.3 - Espectro XRD da Prednisolona	94
Figura 0.4 - Espectro XRD da Lisina	96

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Interpretação do expoente “n” na equação de Korsmeyer-Peppas [8]	9
Tabela 1.2 - Métodos de microencapsulação [10]	13
Tabela 1.3 - Materiais utilizados em microencapsulação [14]	16
Tabela 1.4 - Propriedades biológicas do quitosano [2] [18]	18
Tabela 3.1 - Diâmetro e desvio padrão das partículas de quitosano	44
Tabela 3.2 - Valores de carregamento de fármaco e de eficiência de encapsulamento das micropartículas produzidas com quitosano	51
Tabela 3.3 - Diâmetro e desvio padrão das partículas de EPS	55
Tabela 3.4 - Valores de carregamento de fármaco e de eficiência de encapsulamento das micropartículas produzidas com EPS	61
Tabela 3.5 - Velocidade inicial de liberação de fármaco para partículas de quitosano	65
Tabela 3.6 - Velocidade inicial de liberação de 5FU para partículas de EPS	68
Tabela 3.7 - Velocidade inicial de liberação de Prednisolona para partículas de EPS	70

Abreviaturas

Q	Quitosano
EPS	Polissacarídeo extracelular FucoPol
AG	Ácido glutâmico
AC	Ácido cítrico
Lis	Lisina
5FU	5-Fluourouracil
P	Prednisolona
SEM	Microscopia electrónica de varrimento
FT-IR	Espectroscopia de infravermento por transformada de Fourier
XRD	Difracção de raios-X
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

1. Introdução

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

1.1. Objectivos

O objectivo principal deste trabalho incide na encapsulação de fármacos em matrizes de polissacarídeos, sob a forma de micropartículas, com vista à sua protecção e libertação controlada no intestino. Para cumprir o objectivo proposto, foram seguidos os seguintes objectivos específicos:

- Estudo de duas várias matrizes encapsulantes (quitosano e FucoPol);
- Avaliação do efeito de vários agentes reticulantes (ácido glutâmico e ácido cítrico no quitosano e lisina para o FucoPol);
- Caracterização das micropartículas em termos de morfologia, tamanho, propriedades químicas e térmicas;
- Quantificação do grau de encapsulamento;
- Estudo do perfil de libertação da substância activa com as diferentes matrizes em meios ácido e neutro, correspondentes ao estômago e intestino respectivamente.

1.2. Libertação controlada

A libertação de um fármaco no seu local de acção de forma a produzir o efeito farmacológico pretendido é o objectivo dos sistemas de libertação controlada.

É sabido que os sistemas biológicos contêm diversos mecanismos de defesa que servem para proteger o sistema de substâncias estranhas ao seu universo. Qualquer fármaco, entregue por qualquer via, encontrará, quase certamente, algumas destas barreiras antes de atingir o seu local de acção.[1] A forma como este poderá interagir com os diferentes obstáculos depende de uma série de aspectos de natureza diversa, tais como:

- As propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco.
- A via de administração e as consequentes barreiras fisiológicas e bioquímicas impostas à absorção do fármaco.
- As propriedades do material/materiais base do sistema de libertação de fármaco: propriedades físico-químicas, biocompatibilidade, comportamento in vivo, interações com o fármaco, etc.
- Os métodos e tecnologias envolvidas na produção do sistema de libertação do fármaco.[2]

As barreiras a serem ultrapassadas pelos fármacos em sistemas de libertação controlada podem ser classificadas como fisiológicas, bioquímicas e químicas. As barreiras fisiológicas quando os fármacos são administrados por via oral encontram-se na mucosa intestinal onde protegem o corpo de várias moléculas, como por exemplo as toxinas, impedindo a sua passagem. As enzimas têm a função de degradar substâncias, estão incluídas nas barreiras bioquímicas. Quanto às barreiras químicas, estas encontram-se relacionadas com as interações químicas do fármaco com o meio biológico, e dependem da estrutura e propriedades do fármaco, tais como solubilidade, permeabilidade, comportamento com o pH e outros. Estas barreiras podem ser ultrapassadas modificando o fármaco ou protegendo-o.

Além de atingir o local certo, ultrapassando este tipo de barreiras, o fármaco tem de manter um nível de concentração ao nível terapêutico por um período de tempo específico. Para que tal aconteça existem vários métodos de administração de fármacos. [1] Neste contexto, o termo “fármaco” engloba todos os compostos bioactivos administrados com

intuíto terapêutico, desde moléculas de baixo peso molecular a proteínas e a material genético.[2]

A primeira forma existente de administrar um medicamento foi numa única dose, onde a libertação é imediata. É utilizada quando o tratamento requer apenas actuação do fármaco por um curto período de tempo. Pelo contrário, em casos de problemas crónicos o objectivo incide em manter a concentração de fármaco constante num nível terapêutico por algum tempo. A administração em doses múltiplas pode ser uma solução para manter o fármaco num nível desejado por períodos de tempos alargados. No entanto existem desvantagens neste método de administração, como a necessidade de o paciente se comprometer a tomar a dosagem correcta para que o nível terapêutico do fármaco durante o período de tratamento se mantenha e o desconforto causado pelas várias administrações. De forma a evitar este problema existem métodos de libertação não imediata. Na Figura 1.1 são demonstradas as variações da concentração do fármaco no organismo ao longo do tempo nas situações de administração de fármacos acima descritas.

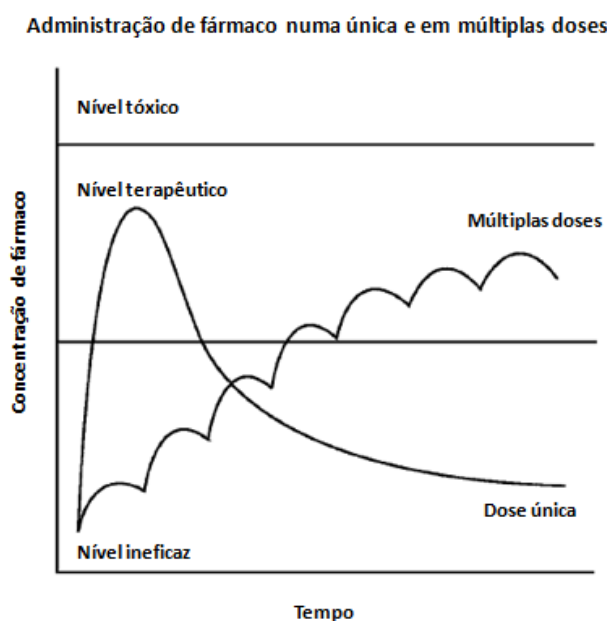


Figura 1.1 - Gráfico da concentração de fármaco em função do tempo para dose única e múltipla, adaptado de [1].

Os mecanismos de libertação não imediata são de três tipos: libertação retardada; libertação prolongada e libertação controlada.

A libertação retardada permite que várias doses de medicamento sejam incorporadas numa única, desta forma elimina-se a desvantagem da administração de fármaco em doses

múltiplas onde o paciente tem de ter a responsabilidade de realizar a toma na altura certa. O sistema de libertação prolongada aumenta a duração da libertação de fármaco, diminuindo a velocidade de libertação de fármaco comparando com o sistema de libertação imediata. O objectivo dos sistemas de libertação controlada é manter a concentração de fármaco constante no local, fazendo com que a velocidade de libertação seja igual à velocidade de consumo do fármaco, durante o período desejado. [1]

No entanto estes mecanismos de libertação não imediata têm desvantagens que devem ser tidas em conta no momento da escolha do tratamento de um doente, tais como, o facto de não ser possível o fim imediato da sua acção terapêutica caso sejam observadas reacções adversas no paciente e a dificuldade em ajustar os regimes posológicos que são definidos durante a concepção da forma farmacêutica. Os factores económicos também tem que ser tidos em conta pois estão envolvidos processos e equipamentos mais dispendiosos. [1][3]

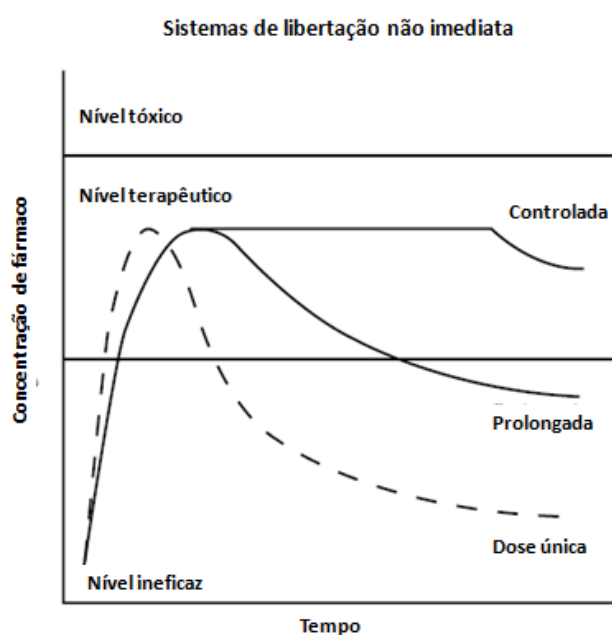


Figura 1.2 - Gráfico da concentração de fármaco em função do tempo para diferentes sistemas de libertação, adaptado de[1].

Um sistema de libertação controlada bem projectado pode permitir ultrapassar alguns problemas que existem na terapia convencional, além disso, pode também melhorar o efeito terapêutico do fármaco. Para se obter a máxima eficiência terapêutica do fármaco será necessário fazer com que este alcance o seu destino na quantidade óptima no período de tempo certo, para que a toxicidade e os efeitos secundários sejam mitigados. [4]

1.2.1. Mecanismos de libertação

Os sistemas de libertação controlada que são preparados a partir de materiais poliméricos podem ser divididos em três grandes categorias, dependendo do mecanismo que conduz a libertação do fármaco: os sistemas de libertação controlados por difusão; os sistemas de libertação activados pelo solvente e os sistemas de libertação controlados por acção química.

Em relação aos sistemas de libertação controlados por difusão, estes são os mais comuns e são de dois tipos: sistemas de reservatório e sistemas matriciais. Um sistema de reservatório consiste num dispositivo constituído por um núcleo de fármaco, no estado líquido ou sólido, protegido por uma membrana polimérica não biodegradável, através do qual o fármaco se difunde lentamente. Geralmente, estes dispositivos assumem uma geometria esférica, cilíndrica ou na forma de disco. Num sistema matricial o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica. Nestes sistemas a taxa de libertação é controlada pela taxa de difusão do fármaco através do polímero que depende das propriedades do fármaco e da membrana polimérica.

Os sistemas de libertação activados pelo solvente, onde o solvente não reage com o polímero mas inicia a libertação do fármaco através da pressão osmótica ou pela absorção de água (*swelling*). O sistema de libertação controlado pela pressão osmótica faz com que o fármaco se liberte devido à pressão osmótica junto à membrana polimérica semi-permeável (permeável ao solvente mas não ao soluto), criada devido à diferença de concentrações do fármaco no exterior e interior da membrana, originando um fluxo de fluido do exterior para o interior do dispositivo, forçando o fármaco contido no interior a sair. Em relação aos sistemas de libertação controlados pela absorção de água, a matriz polimérica onde o fármaco está disperso tem a capacidade de absorver uma grande quantidade de água sem se dissolver, assim a taxa de libertação é essencialmente controlada pela taxa de absorção de água pela matriz.

O terceiro mecanismo de libertação é controlado por acção química, o qual se pode dividir em sistemas de cadeias pendentas e em sistemas biodegradáveis. Os sistemas de cadeias pendentas, também conhecidos como pró-fármacos consistem em fármacos com uma cadeia de polímero quimicamente ligada a si, em que estas ligações se quebram/degradam por hidrólise ou acção enzimática, fazendo desta forma a libertação do fármaco a uma taxa

controlada. Nos sistemas biodegradáveis o fármaco disperso na matriz polimérica liberta-se à medida que esta é desintegrada.

Na prática, alguns sistemas de libertação controlada não encaixam perfeitamente em nenhum dos anteriormente mencionados, pois em muitos casos não existe um mecanismo dominante que defina a libertação do fármaco, podendo este ser determinado pela combinação de vários dos mecanismos descritos. [2][5]

1.2.2. Modelos cinéticos

O estudo *In vitro* da libertação controlada é um elemento importante do desenvolvimento do dispositivo. Existem vários modelos cinéticos que podem descrever a dissolução do fármaco ao longo do tempo. [6] Seguidamente serão descritos alguns dos modelos existentes que podem ser utilizados nestes sistemas de libertação.

Modelo de ordem zero

Um modelo ideal de libertação controlada deve seguir uma cinética de ordem zero. Este não dependeria da quantidade de fármaco presente nas partículas e a concentração de fármaco no sangue permaneceria constante ao longo do tempo de libertação. Este tipo de libertação tem sido bastante investigado pois existe uma variedade de fármacos em que é importante manter a mesma concentração, por exemplo, antibióticos, medicamentos para pressão arterial, analgésicos e antidepressivos. A expressão simples que caracteriza uma libertação desta ordem pode ser descrita da seguinte maneira:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

Onde Q_t é a quantidade de fármaco libertada no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco em solução e K_0 é a constante de libertação de ordem zero. [6] [7]

Modelo de Higuchi (cinética de meia ordem)

Higuchi descreve a libertação como um processo de difusão descrito pela Lei de Fick, ou seja, dependente da raiz quadrada do tempo.

$$Q_t = K_H t^{1/2}$$

Onde Q_t é a quantidade fármaco libertada no tempo t , K_H é a constante de dissolução de Higuchi.[7][6]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

Modelo de primeira ordem

Se a velocidade de libertação do fármaco depender da sua quantidade presente no sistema estamos diante uma cinética de primeira ordem. A equação proposta por Noyes e Whitney, onde a forma integrada da equação é:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$$

Onde Q_t é a quantidade de fármaco libertada no momento t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco em solução (normalmente $Q_0=0$) e K_1 é a constante de libertação de primeira ordem.[7][6]

Modelo de Korsmeyer-Peppas

Em 1983, Korsmeyer desenvolveu um modelo semi-empírico simples que descreve a libertação de fármaco exponencialmente ao longo do tempo.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K t^n$$

Onde Q_∞ é a quantidade total de fármaco e K_K é a constante de libertação de Korsmeyer, n é um parâmetro empírico que caracteriza o mecanismo de libertação.

Tabela 1.1 - Interpretação do expoente “n” na equação de Korsmeyer-Peppas[8]

Geometria	Expoente “n”	Mecanismo de transporte
Filme	< 0,5	Difusão Fickiana
	0,5 < n < 1,0	Transporte anómalo
	1,0	Transporte caso II
	> 1,0	Transporte super caso II (não-Fickiana)
Cilíndrica	< 0,45	Difusão Fickiana
	0,45 < n < 0,89	Transporte anómalo
	0,89	Transporte caso II (não-Fickiana)
	> 0,89	Transporte super caso II
Esférica	< 0,43	Difusão Fickiana
	0,43 < n < 0,85	Transporte anómalo
	0,85	Transporte caso II (não-Fickiana)
	> 0,85	Transporte super caso II

A Tabela 1.1 revela os valores que “n” toma e qual o mecanismo de transporte a ele associado. A difusão Fickiana ocorre quando existe difusão molecular do fármaco em virtude

de um gradiente químico. Quando a libertação é completamente não-Fickiana (ou mecanismo de transporte caso II) o mecanismo de transporte de fármaco está associado ao *stress* e estado de transição em polímeros hidrófilicos vítreos que incham em água ou fluidos biológicos. Este termo também inclui a erosão e destruição da rede polimérica. No transporte anômalo podem ocorrer os dois fenómenos em simultâneo, difusão e transporte caso II. No transporte super caso II, a libertação é controlada pela relaxação macromolecular das cadeias de polímero.[7] [8][6]

Modelo de Hixson-Crowell

A lei da raiz cúbica de Hixson-Crowell descreve a libertação em sistemas em que a área da superfície e o diâmetro das partículas ou cápsulas se altera ao longo do tempo. No caso de um fármaco que consiste em partículas de tamanho uniforme é possível descrever a equação que expressa a taxa de dissolução através da raiz cúbica das partículas.

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$$

Onde Q_t é a quantidade de fármaco libertado no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na cápsula e K_s é a constante que relaciona a área e o volume da partícula.[7] [8][6]

1.3. Microencapsulação

A microencapsulação é o processo que consiste na envoltória de uma substância, sólida, líquida ou mesmo na forma gasosa, por uma membrana de maneira a formar uma cápsula com um tamanho na ordem dos micrómetros.[9][4]

É uma técnica que pode ser utilizada de forma a aumentar a eficácia de diversos compostos na indústria. Na libertação controlada, tal como outras técnicas deste ramo, permite a reformulação de uma grande quantidade de alimentos e productos farmacêuticos, melhorando-os e providenciando melhores e novas propriedades. [8]

O processo de microencapsulação de substâncias teve início no final dos anos 30. Mas foi apenas a partir de 1950 que se tem estendido a investigação sobre microencapsulação, primeiramente devido às suas aplicações na biomedicina para libertação de fármacos, e mais tarde para implantação celular e terapia génica.

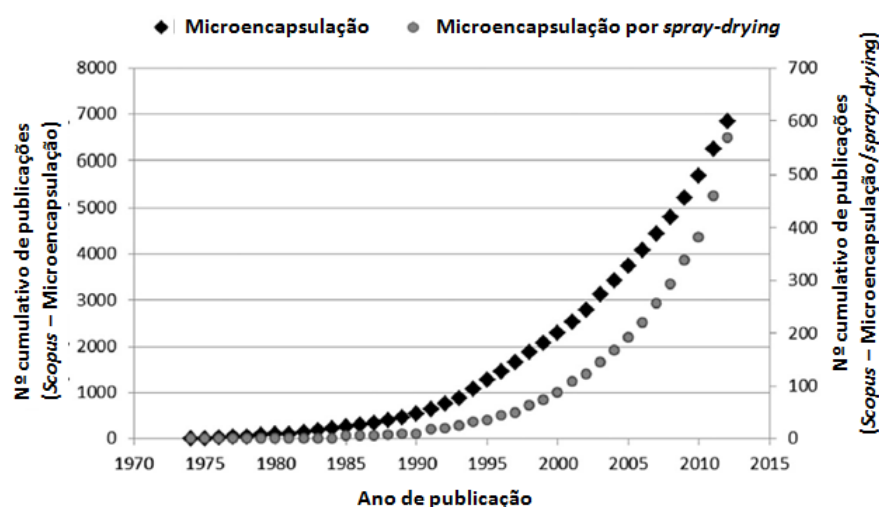


Figura 1.3 - Número cumulativo de artigos publicados sobre microencapsulação e microencapsulação por *spray-drying* desde 1974. [8]

Também têm sido exploradas aplicações de micropartículas no ramo da biotecnologia como a sua utilização em fermentação e em culturas biológicas em grande escala. [9] Além destas é utilizada em várias áreas da indústria, principalmente na indústria alimentar como estratégia de adição de compostos funcionais, aditivos, corantes e aromatizantes; na indústria farmacêutica com o objectivo de criar princípios activos ou vacinas com libertação controlada; nos cosméticos; na indústria têxtil; e também tem sido a ser utilizada na agricultura.[8]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

Na libertação controlada, a microencapsulação é utilizada para atrasar ou modificar a libertação do fármaco, como por exemplo, encapsulando fármacos anticancerígenos com o objectivo de este alcançar o local específico do tumor. [4]

Além desta vantagem, existem outras razões para que se continue a microencapsular substâncias, como: [10]

- Mascara o paladar dos fármacos;
- Reduzir as irritações gastrointestinais;
- Manipular as propriedades do princípio activo;
- Proteger o princípio activo de degradações e outros efeitos que destruam as moléculas de interesse a encapsular.

1.3.1. Classificação de micropartículas com compostos encapsulados

As micropartículas podem ser classificadas em relação à sua morfologia em três categorias: mononuclear; polinuclear e do tipo matriz.

As micropartículas do tipo mononuclear consistem numa cápsula em redor do núcleo, enquanto que as polinucleares, assim como o nome indica, apresentam vários núcleos. Quando se está perante micropartículas do tipo matriz, a substância activa encontra-se homogeneamente dispersa no material encapsulante.

Além destes três tipos apresentados, as micropartículas podem apresentar múltiplas cápsulas ou podem formar aglomerados. [10]

1.3.2. Técnicas de microencapsulação

Existem várias técnicas disponíveis para a encapsulação de materiais. Os métodos podem ser divididos em três grandes grupos. Estes grupos e algumas técnicas de microencapsulação encontram-se na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Métodos de microencapsulação[10]

Métodos Químicos

- Polimerização interfacial
- Polimerização *in situ*
- Policondensação

Métodos Físico-químicos

- Coacervação e separação de fases
- Encapsulação sol-gel
- Microencapsulação assistida por CO₂ supercrítico

Métodos Físico-mecânicos

- *Spray-drying*
- Congelamento
- Resvestimento de leito fluido
- Revestimento em bacia
- Evaporação de Solvente

O método de encapsulação utilizado neste trabalho foi o de secagem por atomização ou *spray-drying*.

O processo de *spray-drying* é uma técnica na qual um líquido é atomizado por uma corrente de gás quente produzindo, instantaneamente, um pó. O líquido que alimenta o *spray-dryer* pode ser uma solução, uma emulsão ou uma suspensão. Normalmente o gás utilizado neste processo é ar e, nalguns casos mais raros, azoto.

Manipulando as condições de operação, designadamente o caudal de alimentação de ar, a temperatura do ar de secagem, a concentração da solução de alimentação em termos de substância activa e de matriz encapsulante, a pressão do gás comprimido e o tamanho da abertura por onde é atomizada a solução, podem ser produzidas partículas de diversos tamanhos.[11]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

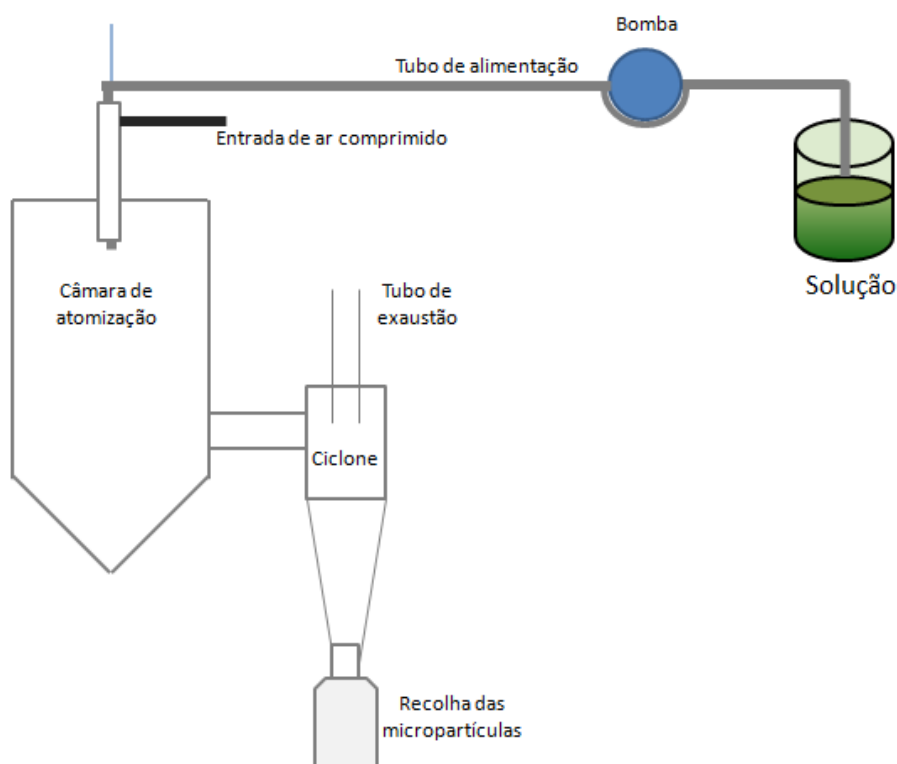


Figura 1.4 - Esquema do processo de microencapsulação por *spray-drying*

A solução ou suspensão a alimentar ao spray-dryer é constituída pelo material da matriz encapsulante, pelo princípio activo e por um solvente apropriado. Esta mistura é então bombeada para uma câmara de atomização. Para a entrada do líquido nesta câmara podem ser usados dois tipos de atomizadores: injector com pressão ou com disco giratório. Consoante a energia fornecida ao atomizador o diâmetro das gotículas também é alterado, sendo tanto menor quanto maior a energia. À medida que as gotículas entram em contacto com o ar quente dentro da câmara, a uma temperatura entre 150°C e 220°C, estas adquirem forma esférica. A temperatura a que as micropartículas estão expostas não ultrapassa os 100°C devido à rápida evaporação da água presente nas gotículas e ao baixo tempo de residência das partículas formada na câmara de secagem.[11] [12]

As micropartículas formadas são transportadas pela corrente de ar de secagem para um ciclone, onde se procede à separação sólido gás de modo a possibilitar a recuperação das micropartículas.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

As partículas produzidas com esta técnica, normalmente, são do tipo matriz, onde o princípio activo é distribuído uniformemente pelo material encapsulante. Este tipo de microcápsulas resulta num mecanismo de libertação pela acção de solvente e por difusão.[13]

Spray-drying é a técnica de produção de materiais microencapsulados mais comum e menos dispendiosa. Quando existem problemas de secagem num processo com os métodos convencionais o *spray-drying* tem sido considerado como solução eficiente. Este tem sido utilizado na indústria com o objectivo de assegurar a estabilidade microbiológica dos produtos, evitar o risco de degradação química e/ou biológica e obter um produto com propriedades específicas.[11]

1.4. Matrizes de base polimérica

Têm sido utilizados e investigados uma variedade de polímeros na preparação de micropartículas, desde os naturais aos sintéticos. A escolha deste vai depender da sua interacção com o conteúdo que se pretende encapsular e das características desejadas nas micropartículas. As diferentes combinações de materiais podem fazer com que seja mais ou menos difícil encapsular o material uniformemente, no entanto é possível formar partículas com forma esférica utilizando os materiais certos. [14]

Tabela 1.3 - Materiais utilizados em microencapsulação [14]

Natural		Sintéticas
Agar		Polímeros acrílicos
Albumina		Poli(orto esters)
Alginatos		Poliuretanos
Caseína		Poliamidas
Quitosano		Poliestireno
Colagénio		Polietileno-glicol
Dextrina		Poli(etileno-vinil- acetato)
Gelatina		Dimetil polissiloxano
Glúten		Polivinil acetato ftalato
Goma arábica		Álcool Polivinílico
Pectina		Polivinil pirrolidona
Amido		
Ceras		
	Cera de abelha	
	Cera de carnaúba	
	Parafina	
	Espermacete	
Zeínas do milho		
Derivados da celulose		
Poli-lisina		
Shellac		

Na Tabela 1.3 estão descritos os diferentes materiais que podem ser utilizados para microencapsulação. Estes materiais são moléculas de elevado peso molecular e possuem

características hidrofóbicas ou hidrofílicas. Graças à diferente polaridade de cada um destes compostos pode-se adaptar a matriz relativamente às necessidades do produto. [14]

Apesar dos polímeros sintéticos apresentarem elevada estabilidade química e oferecem a possibilidade de adaptar e manipular a sua composição e estrutura de forma a ir ao encontro dos requisitos da aplicação, por vezes não apresentam biocompatibilidade o que limita o seu potencial em aplicações clínicas.

A maioria dos polímeros naturais consistem em proteínas (como a albumina e a gelatina), polissacarídeos (como o quitosano e o alginato) e polihidroxialcanoatos. Como estes polímeros naturais apresentam sempre baixa ou mesmo nenhuma toxicidade, baixa imunogenicidade e consequentemente elevada biocompatibilidade (uma das características mais importantes para biomateriais utilizados em clínica) são os preferidos para sistemas de microencapsulação.[15][2]

Neste trabalho foram utilizados dois polissacarídeos, o quitosano e o Fucopol, como material de encapsulação.

1.4.1. Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo catiónico obtido através da desacetilação da quitina. A quitina é o segundo polímero natural mais abundante no mundo, a seguir à celulose, e pode ser encontrada no exoesqueleto de insectos e crustáceos, nas paredes celulares de fungos, entre outros.

Na produção de quitosano, raramente se completa o processo de desacetilação por isso a molécula de quitosano é composta por dois monossacarídeos, N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina ligados por ligações glicosídicas β -(1→4). A quantidade de glucosamina na molécula determina o seu grau de desacetilação, que pode variar entre 40% e 98%. [8][16][17]

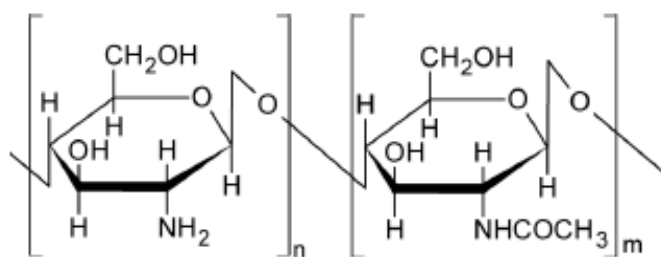


Figura 1.5 - Estrutura química do quitosano ($n > 60$)[2]

Esta molécula é solúvel em meios ácidos, pH inferior a 6,3, devido à protonação dos grupos amina livres ($-NH^2$). É a presença destes grupos amina e de grupos hidroxilo ($-OH$), visíveis na Figura 1.5, em diferentes quantidades que permite a alteração da estrutura do quitosano, conferindo-lhe assim uma grande versatilidade de aplicações.[16][17]

Tabela 1.4 - Propriedades biológicas do quitosano[2][18]

Biodegradável
Biocompatível
Propriedades bioadesivas/mucoadesivas
Promotor de absorção
Actividade anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana
Promotor da regeneração de vários tecidos (pele, tecido ósseo...)
Hemoestático
Antitrombogénico

Todas as propriedades acima descritas fazem do quitosano um óptimo material para diversas aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentar.

1.4.2. Polissacarídeo extracelular, FucoPol

O FucoPol é um polissacarídeo extracelular (EPS) desenvolvido no Laboratório da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, produzido a partir da Enterobactéria A47 DSM 23139, pertencente à família das bactérias Gram-positivas.[19]

Existem outros polissacarídeos extracelulares produzidos através de bactérias, mas apenas alguns são economicamente viáveis, como o ácido hialorónico, a goma gelana, a goma chantana. De forma a tornar o processo de produção de FucoPol rentável, além da optimização do processo de produção, este utiliza glicerol como fonte de carbono, um subproduto da produção de biodiesel.[19] A utilização desta fonte de carbono apresenta grandes vantagens uma vez que apresenta baixo custo e a sua viabilidade poderá aumentar com a evolução do consumo de biodiesel.[20]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

Este novo EPS é um polissacarídeo aniónico de elevado peso molecular ($\sim 5,0 \times 10^6$) em que fazem parte da sua composição os açúcares neutros: fucose (32-36 %mol); galactose (25-26 %mol); glucose (28-34 %mol) e ácido glucurónico (9-10 %mol) e grupos acilo de que fazem parte: acetilo (3-5 %mol); piruvato (13-14 %mol) e succinato (3 %mol). Existem outros açúcares no polímero, manose e ramnose, que se encontram em pequena quantidade (<1%). É a presença do piruvato e succinato que confere o carácter aniónico ao FucoPol.[19] [21][22]

A composição apresentada pode ser alterada, visto que a alteração das condições de operação do bioreactor resulta na alteração da composição do EPS, que é bastante influenciada por estes parâmetros.

O facto de este polissacarídeo conter fucose torna-o num produto de elevado valor no mercado, dado que a fucose é um açúcar raro, de difícil obtenção e apresenta variadas propriedades vantajosas para o organismo humano. Estudos recentes têm indicado propriedades anti-cancerígenas, de prevenção dos diabetes, anti-inflamatórias, anti-envelhecimento e de inibição das reacções alérgicas na pele.[23]

1.5. Reticulação

Os polissacarídeos utilizados como matriz de encapsulação apresentam, no entanto, uma limitação pelo facto de serem moléculas muito hidrofílicas, devido à presença de grupos hidroxilo, carboxílico, amina e outros na sua estrutura. Assim, em meio aquoso os polissacarídeos permitem uma rápida entrada de água na partícula, aumentando o seu volume e provocando a sua degradação, o que causa uma libertação precoce do fármaco. Com o objectivo de diminuir a entrada de água e a rápida libertação de fármaco, pode proceder-se à reticulação do polissacárido, sob a acção de um agente reticulante, promovendo o estabelecimento de ligações covalentes entre as cadeias de polímero.

Para os dois polissacarídeos utilizados neste projecto, os agentes de reticulação podem estabelecer ligações covalentes ou iónicas com o polímero, criando uma espécie de rede onde a substância activa fica retida. [8]

Os reticulantes utilizados para estabelecer ligações covalentes são moléculas que apresentam no mínimo dois grupos funcionais livres que permitam estabelecer pontes entre as cadeias poliméricas. Muitos dos reticulantes descritos na literatura normalmente são tóxicos e portanto a sua utilização em aplicações farmacêuticas e alimentares é limitada. Neste trabalho foram testadas como agentes reticulantes três moléculas biocompatíveis.

As micropartículas reticuladas com compostos iónicos são consideradas mais biocompatíveis. A sua rede pode não ser permanente quando forma por vezes ligações reversíveis. Estas ligações apresentam sensibilidade às diferenças de pH do meio, o que pode aumentar o seu potencial como reticulantes. Estes são normalmente bem aceites pelo organismo, sendo uma vantagem para o uso terapêutico.[8]

Como agentes reticulantes do quitosano foram utilizados o ácido cítrico e o ácido glutâmico. Como agente reticulante do FucoPol, foi utilizada a lisina.

O ácido cítrico é o composto responsável pelo sabor ácido dos limões, limas, toranjas, laranjas e outros citrinos. À temperatura ambiente, este é um pó cristalino. [24]

O ácido cítrico apresenta a particularidade de ser um produto metabólico de quase todos os seres vivos (Ciclo de Krebs) e não ser tóxico para o corpo humano.[25]

Normalmente, a produção de ácido cítrico comercial é feita a partir da fermentação da sacarose ou melaço pelo fungo *Aspergillus niger*, da família das penicilinas, ou sinteticamente a partir da acetona ou do glicerol. Aproximadamente 75% da produção mundial de ácido cítrico é utilizada na indústria alimentar e 12% na indústria farmacêutica. [26]

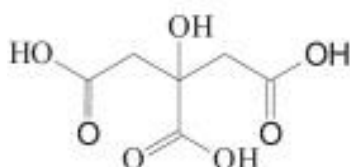


Figura 1.6 - Estrutura química do ácido cítrico[27]

Este composto, representado na Figura 1.6, possui três grupos carboxílicos, que apresentam uma densidade de carga negativa. Apesar de o ácido cítrico ter cargas opostas às do quitosano, a ligação entre estes compostos é covalente, como demonstra a Figura 1.7.[28]

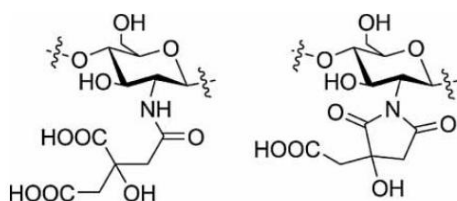


Figura 1.7 - Interação entre o ácido cítrico e o quitosano [28]

Quando se utiliza ácido cítrico como como reticulante do quitosano, os grupos amina do quitosano reagem com o ácido cítrico formando estruturas amida laterais. Estas ligações na matriz polimérica aumentam a resistência de entrada de água nas partículas durante a libertação do fármaco.[28]

O ácido glutâmico ou ácido (2S)-2-aminopentanedioico é um aminoácido que contém dois grupos carboxílicos e um grupo amina, devido à sua estrutura trata-se de um aminoácido carregado negativamente. A sua estrutura é representada na Figura 1.8.

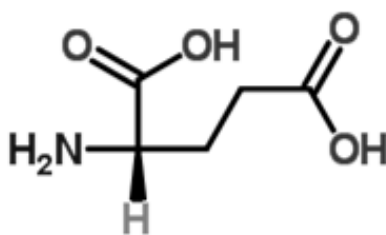


Figura 1.8 - Estrutura química do ácido glutâmico[29]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

É utilizado como aditivo alimentar, mais conhecido por glutamato. A mais importante característica deste composto é o seu papel na transdução dos sinais eléctricos no sistema nervoso, aparentemente em todos os organismos vivos complexos. O ácido glutâmico está envolvido na maioria das funções cerebrais, como cognição, memória e aprendizagem e é considerado o maior mediador dos sinais excitatórios no sistema nervoso central dos mamíferos.[30]

A lisina é um aminoácido essencial, com dois grupos amina e um grupo carboxílico. O grupo ϵ -amina, presente na cadeia de carbonos mais longa é bastante reactivo, pois encontra-se mais exposto ao meio envolvente que os outros grupos, por isso este grupo específico apresenta um $pK_a=10,5$. [31]

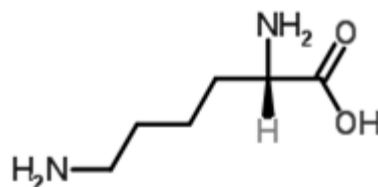


Figura 1.9 - Estrutura química da L-Lisina [29]

Foi testada como ansiolítico (diminui ansiedade e tensão) e demonstrou ter efeitos nos receptores de serotonina no tracto intestinal, tal como existe a possibilidade de reduzir ansiedade através da regulação de serotonina nas amígdalas.[32] Pode ser boa para pessoas com infecções de herpes.[33]

1.6. Fármacos Modelo

Na realização deste trabalho, foram utilizados como fármacos modelo, um anticancerígeno, o 5-Fluorouracil, e um anti-inflamatório, a Prednisolona.

1.6.1. 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (5FU) foi introduzido no mercado pela primeira vez no ano de 1957 e desde então que é parte essencial de vários tratamentos anti-cancerígenos. O 5FU tem actividade anti-tumoral contra o aparecimento de neoplasias malignas de origem epitelial no trato gastrointestinal, na mama e também na cabeça e no pescoço. No entanto, este é prescrito mais usualmente para o tratamento do cancro colorectal.[34]

Exerce o seu efeito nas células proliferativas interferindo na síntese do ADN. Nalguns estudos de farmacologia celular e molecular em células *in vitro* e *in vivo* têm-se observado diferenças no crescimento celular na presença de 5-FU, onde as células são afectadas em todas as fases do ciclo celular e outros estudos mostram que 5-FU bloqueia apenas o ciclo celular nas fases G1 e S. Estes resultados indicam que não se sabe ao certo o funcionamento do mecanismo de acção do 5-FU mas tem-se feito pesquisa no sentido de melhor entendimento do seu funcionamento nas células. [35]

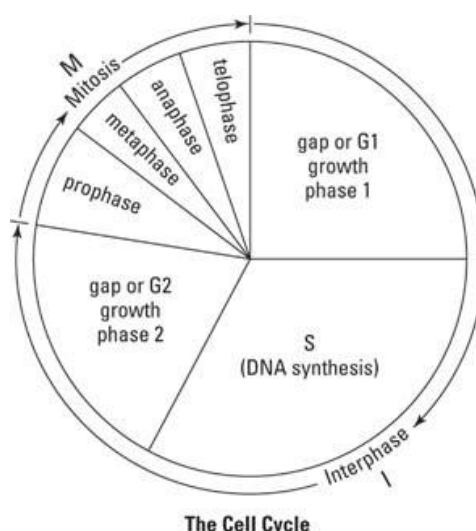


Figura 1.10 - Diagrama do ciclo celular [36]

O 5-FU é um fármaco de reduzido peso molecular, 130,08 g/mol, e a sua estrutura química é apresentada na Figura 1.11.

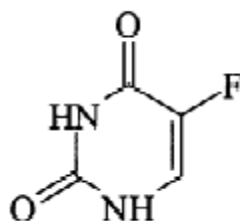


Figura 1.11 - Estrutura química do 5FU[37]

Este fármaco apresenta uma elevada solubilidade em água, 25,9g/L, e tem sido encapsulado em matrizes de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLAGA), alginato, álcool polivinílico, etilcelulose, quitosano, entre outros.[38][39][40] [41]

1.6.2. Prednisolona

A Prednisolona é um glucocorticóide e o seu nome IUPAC é (8S,9S,10R,11S,13S,14S,17R)-11,17-dihidroxi-17-(2-hidroxiacetyl)-10,13-dimetil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H ciclopenta[a]penantren-3-one. A sua estrutura química encontra-se na Figura 1.12.

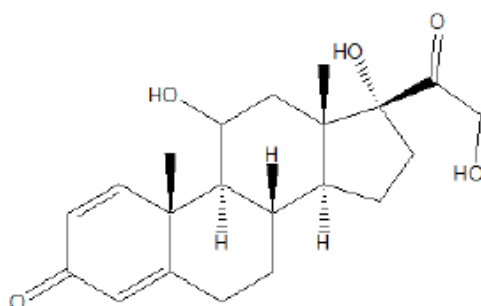


Figura 1.12 - Estrutura química da Prednisolona[42]

Este fármaco é utilizado como anti-inflamatório ou agente imunossupressivo em várias patologias, o que significa que não actua sobre o desenvolvimento da doença subjacente, apenas proporciona um alívio dos sintomas. [43] É um dos fármacos receitados para a doença de Crohn, um tipo de doença inflamatória intestinal, também utilizado em doenças dermatológicas (dermatite, líquen, psoríase), doenças reumáticas, alérgicas ou inflamatórias. [44][45]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

A sua utilização neste trabalho prático é importante, pois nunca se estudou a microencapsulação aplicada à Prednisolona. É um fármaco com uma solubilidade muito baixa, 221 mg/L, sendo praticamente insolúvel em meio ácido o que dificulta a sua administração por via oral, podendo precipitar no estômago e causar úlceras e irritações no estômago.[29]

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Introdução

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

2. Materiais e métodos

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

Ao longo deste capítulo descreve-se o trabalho realizado para o desenvolvimento dos sistemas de libertação controlada de fármacos sob a forma de micropartículas de quitosano e FucoPol. Com este objectivo, preparam-se micropartículas destes dois polissacarídeos com dois fármacos diferentes, 5FU e Prednisolona, imobilizados no polímero através da técnica de *spray drying*.

2.1. Materiais

Os polissacarídeos utilizados para a produção das micropartículas foram o quitosano, fornecido pela G.T.C. Bio Corporation e o polissacárido extracelular (FucoPol), produzido no *Biochemical and Process Engineering Group* (BPEG), da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.

Na produção de micropartículas por *spray-drying*, foram utilizados o ácido acético glacial 99-100%, fornecido pela Chem-Lab, etanol fornecido pela Riedel-de Haen.

Os agentes reticulantes utilizados ácido cítrico, fornecido pela Panreac, L-ácido glutâmico >99% e a L-lisina foram, ambos fornecidos pela Sigma.

E os fármacos utilizados neste estudo foram o 5-Fluorouracil e a Prednisolona fornecidos pela Sigma.

Nos ensaios de libertação foram utilizados o cloreto de sódio (NaCl) da Panreac, o ácido clorídrico (HCl) comercial da LabChem, o hidróxido de sódio (NaOH) em pellets da HIMedia Laboratories e o fosfato monopotássico dihidrogenado (KH₂PO₄) da Panreac.

2.2. Métodos

2.2.1. Produção de FucoPol

O polissacarídeo extracelular foi produzido pela bactéria *Enterobacter* A47, esta foi inoculada num bioreactor de 10L operado à temperatura de 30,0°C e pH igual a 6,8. Durante o primeiro dia de crescimento da cultura o bioreactor operou em modo batch, durante mais três dias o bioreactor opera em modo fed-batch com alimentação de glicerol (solução de 200 g.L⁻¹) com um caudal constante de 20 mL.h⁻¹.

Na extracção e purificação do polissacarídeo produzido utilizou-se apenas metade da cultura resultante e foi necessário efectuar vários passos. Começou-se por diluir a cultura em 1:3 (v/v) com água desionizada com o objectivo de diminuir a viscosidade da solução resultante da fermentação. A solução já diluída foi depois submetida a centrifugação a 8 000 rpm durante 30 minutos, de forma a remover as células presentes em solução. Foi recuperado o sobrenadante que sofreu tratamento térmico durante uma hora a uma temperatura de 70°C. Após o tratamento térmico o fluido foi de novo centrifugado, durante 30 minutos a 8 000 rpm, com o propósito de retirar proteínas que possam ter precipitado com o aumento de temperatura e células que persistiram na solução após a primeira centrifugação.

Depois da centrifugação, o subrenadante resultante foi submetido a um processo de diafiltração, utilizando um módulo de fibras ocas (Modelo: UFP-500-E-6^a, GE Healthcare) com um *cut-off* a uma massa molecular de 500 kDa e uma área superficial de 2800 cm². A pressão transmembranar da operação de diafiltração foi mantida abaixo dos 0,7 bar de modo a remover compostos contaminantes de baixo peso molecular como sais, glicerol e algumas proteínas.

Depois de eliminadas todas as impurezas, o sobrenadante tratado foi concentrado (5:1) usando o mesmo módulo de membranas, através de um processo de ultrafiltração. A solução obtida foi submetida a calor para secar, numa estufa à temperatura de 70°C.

No final de todo o processo de secagem obteve-se 11,6g de polissacarídeo, a partir do volume inicial de caldo de fermentação de 5L.

2.2.2. Preparação de micropartículas

Para a produção das micropartículas, neste estudo foi utilizado o métodos de *spray-drying*.

Preparação das soluções de quitosano

Para as soluções de quitosano começou-se por preparar uma solução de ácido acético a 1% (v/v) na qual o quitosano é solúvel. Nas soluções que contêm fármaco este é adicionado em primeiro lugar numa quantidade de fármaco correspondente a 30% da massa de

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

quitosano a utilizar, em relação ao 5FU. No caso da Prednisolona são adicionados apenas 200mg por cada 100g de solução total, devido à sua baixa solubilidade.

Como a Prednisolona não é solúvel em ácido e muito pouco solúvel em água, às soluções com este fármaco foi adicionado etanol a uma concentração 30% (v/v).

A presença de etanol nas soluções tornou impossível produzir as micropartículas com os reticulantes, ácido cítrico e ácido glutâmico, pois na adição do primeiro à solução de quitosano e Prednisolona formou-se um gel espesso que impossibilitou a passagem deste pela tubagem de alimentação ao *spray-dryer* e o ácido glutâmico precipitou na presença de etanol.

O fármaco é deixado a agitar na solução ácida até total dissolução. De seguida o quitosano é adicionado sob agitação obtendo-se uma solução com 2% (m/m) em quitosano. A solução resultante é deixada a agitar durante a noite.

Passado esse período, nas soluções em que se utilizou reticulante, este foi adicionado numa quantidade de 50% da massa de quitosano, seguindo-se um período de agitação de cerca de 3 horas.

No total, foram preparadas 9 soluções, cada uma com uma massa total de 100g:

1. Quitosano (Q)
2. Quitosano + Ácido glutâmico (Q+AG)
3. Quitosano + Ácido cítrico (Q+AC)
4. Quitosano + 5-Fluorouracil (Q+5FU)
5. Quitosano + Ácido glutâmico + 5-Fluorouracil (Q+AG+5FU)
6. Quitosano + Ácido cítrico + 5-Fluorouracil (Q+AC+5FU)
7. Quitosano + Prednisolona (Q+P)
8. Quitosano + Ácido glutâmico + Prednisolona (Q+AG+P)
9. 9. Quitosano + Ácido cítrico + Prednisolona (Q+AC+P).

Preparação das soluções de FucoPol

O procedimento para a preparação das soluções de FucoPol é semelhante ao anteriormente descrito, sendo que em vez de ácido acético utiliza-se água pois o FucoPol é

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

solúvel em água. Além disso, alterou-se a concentração do reticulante, este foi adicionado numa quantidade de 50%, 75%, 100% da massa de FucoPol utilizada.

Em geral, as soluções preparadas tinham massa total de 75g, sendo estas as seguintes:

1. FucoPol (EPS)
2. FucoPol + lisina a 50% (EPS+Lis50)
3. FucoPol + lisina a 75% (EPS+Lis75)
4. FucoPol + lisina a 100% (EPS+Lis100)
5. FucoPol + 5-Fluorouracil (EPS+5FU)
6. FucoPol + lisina a 50% + 5-Fluorouracil (EPS+Lis50+5FU)
7. FucoPol + lisina a 75% + 5-Fluorouracil (EPS+Lis75+5FU)
8. FucoPol + lisina a 100% + 5-Fluorouracil (EPS+Lis100+5FU)
9. FucoPol +Prednisolona (EPS+P)
10. FucoPol + lisina a 50% + Prednisolona (EPS+Lis50+P)
11. FucoPol + lisina a 75% + Prednisolona (EPS+Lis75+P)
12. FucoPol + lisina a 100% + Prednisolona (EPS+Lis100+P).

As soluções preparadas foram submetidas ao processo de secagem por *spray-dryer*. Para este processo de produção de micropartículas foi utilizado o *Spray dryer* da Lab Plant, modelo SD-05, situado num laboratório do ISA-ULisboa. Foi utilizada uma bomba peristáltica, para efectuar a alimentação das soluções ao equipamento.

Neste equipamento são controladas as condições de temperatura de entrada do ar, a pressão do mesmo, o caudal de entrada de solução de alimentação no sistema e o diâmetro do *nozzle*. Para todas as secagens a temperatura de entrada do ar foi de 200°C, foi utilizada uma corrente de ar comprimido com a pressão de 1,7 bar e um *nozzle* de 0,5 mm de diâmetro. O caudal de entrada de solução foi 9,3 mL/min para as soluções de Quitosano e 3,8 mL/min para as soluções de FucoPol. As condições anteriormente referidas foram optimizadas em trabalhos anteriores.

A realização do processo de *spray-drying* para os diferentes polímeros foi idêntica, apenas a velocidade de bomba divergiu caso fosse uma solução de quitosano ou de FucoPol.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

2.2.3. Caracterização das micropartículas

Morfologia e tamanho por SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

A morfologia e a aparência da superfície das micropartículas podem ser examinadas através de microscopia electrónica de varrimento. O aparelho utilizado para este procedimento foi o microscópio de varrimento da marca JEOL, modelo JSM7001F.

As micropartículas foram colocadas em suporte de alumínio com revestimento de uma liga de Ouro-Paládio.

A forma de caracterização do tamanho das micropartículas foi obtido através da análise e do tratamento estatístico das imagens obtidas através de SEM.

Composição das micropartículas através de FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier foi utilizada de forma a determinar a composição das micropartículas, nomeadamente averiguar a existência de grupos funcionais específicos e ligações químicas presentes. O sistema utilizado foi o Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX.

Para a obtenção dos Espectros de Infravermelho dos diferentes compostos e micropartículas, foram feitas pastilhas de KBr.

Cristalinidade por difração de raios X (XRD)

Um espectro de XRD típico consiste numa série de picos caracterizados pelas suas posições, intensidades e larguras. Estes difractogramas permitem uma caracterização dos materiais a nível constitucional (análise quantitativa e qualitativa de fases) e composicional (identificação de elementos químicos presentes). [46]

As análises de cristalinidade foram realizadas num difractómetro de raios X (PANalytical X'Pert PRO MRD) equipado com um detector X Celerator, com uma geometria BraggBrentano com uma fonte de radiação Cu K-alfa (comprimento de onda 1.540598 Å). As análises foram realizadas com 2θ a variar entre 10º e 90º, com intervalos de 0.033º.

Propriedades térmicas por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*)

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

A Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) é uma técnica utilizada para medir a temperatura e entalpia associada à transição de fase dos materiais em função do tempo e da temperatura. Este tipo de informação permite obter informações sobre a estrutura dos materiais e o seu comportamento.[47]

As análises foram realizadas num Analisador Térmico (TGA-DSC-STA 449 F3 Jupiter da Netzch) que permite a determinação simultânea de efeitos calorimétricos (temperaturas de mudança de fase e entalpias envolvidas) e de alteração de massa.

Aproximadamente 5 mg de micropartículas são colocadas em cápsulas de alumínio, abertas e submetidas a um aquecimento até 550°C com uma velocidade de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de azoto.

Eficiência de encapsulação e Carregamento de fármaco

Para a quantificação do fármaco presente nas micropartículas, dissolveram-se 10mg de micropartículas em 10mL de solução. Para as micropartículas de quitosano, as micropartículas eram dissolvidas em ácido acético 3%(v/v), no caso das micropartículas de EPS, foram dissolvidas em água.

Na presença de Prednisolona nas micropartículas eram adicionados 5mL de etanol de forma a obter uma concentração de 33,33%(v/v).

As soluções foram agitadas por vortex cerca de 10 minutos e de seguida centrifugadas a 9000rpm, a 20°C, durante 7 minutos, sendo retirado o sobrenadante. O fluido resultante foi filtrado através de um filtro de papel e analisado por espectrofotometria UV.

A eficiência de encapsulação consiste na razão entre a quantidade de fármaco que se encontra nas micropartículas e a quantidade utilizada na sua produção.

$$EE(\%) = \frac{\text{massa de fármaco presente nas micropartículas}}{\text{massa de fármaco adicionada na produção}} \times 100$$

A percentagem de carregamento de fármaco nas micropartículas que consiste na razão entre a quantidade de fármaco que se encontra nas micropartículas e a quantidade de micropartículas foi calculada com base na seguinte equação:

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

$$\text{Carregamento de fármaco}(\%) = \frac{\text{massa de fármaco presente nas micropartículas}}{\text{massa das micropartículas}} \times 100$$

Espectrofotometria UV

A absorvância das soluções foi analisada por espectrofotometria UV (Helios α , ThermSpectronic) a 266nm na análise das soluções com 5FU e a 244nm para a Prednisolona.

Para cada amostra existia um branco correspondente, pois o quitosano e o FucoPol também absorvem aos mesmos comprimentos de onda que os fármacos. Para tal, realizaram-se os ensaios de libertação para as partículas vazias.

2.2.4. Ensaios de Libertação

De forma a estudar os perfis de concentração de fármaco ao longo do tempo, simulando o que acontece no sistema digestivo, começando pela libertação no estômago e passando para o intestino, foram realizados ensaios de libertação em soluções de diferentes pH's que correspondessem às diferentes zonas do tracto digestivo utilizando os diferentes tipos de micropartículas produzidas.

No caso da libertação de fármaco no estômago, foi utilizada uma solução designada por Suco Gástrico Simulado sem pepsina (SGF, *Simulated Gastric Fluid*). Esta foi preparada por dissolução de 20 g de cloreto de sódio (NaCl) em 70 mL de ácido clorídrico (HCl) sendo depois adicionada água até fazer um volume de 1000 mL. Esta solução deverá ter um pH=1,2 \pm 0,1. Quando tal não se verificou, ajustou-se o pH adicionando solução de NaOH a 0,2N se o pH era inferior ao pretendido ou HCl a 0,2N quando o pH era superior a 1,2 \pm 0,1.

Para o estudo da libertação de fármaco no intestino utilizou-se o Suco Intestinal Simulado sem pancreatina (SIF, *Simulated Intestinal Fluid*). Este preparou-se dissolvendo 6,8g de KH₂PO₄ em 250mL de água, ao que se adicionou 77 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,2N. Depois foi adicionada água até fazer um volume de 1000 mL. O pH desta solução deverá ser 6,8 \pm 0,1. Quando tal não se verificou procedeu-se da mesma forma que para a solução SGF.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Materiais e métodos

Para a realização dos ensaios de libertação foram adicionadas 4mg de micropartículas em 200 mL de meio de libertação, SGF ou SIF. As micropartículas são adicionadas e a suspensão é colocada num incubador orbital com uma agitação de 160 rpm e a temperatura de 37°C. Ao longo do tempo, a determinados intervalos de tempo, foram retiradas amostras de 1 mL do meio e de seguida foi adicionado 1 mL de meio fresco de modo a manter constante a proporção de massa de partículas por volume de meio ao longo do tempo.

Os ensaios tiveram duração total de 24h de forma a se atingir o equilíbrio.

A quantidade de fármaco presente no meio foi determinada por espectrofotometria UV, conforme descrito em 9.2.4.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para liberação controlada de fármacos" - Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Resultados e discussão

Neste capítulo são apresentadas as propriedades estudadas das micropartículas de quitosano e de EPS, produzidas por *spray-drying*, mais relevantes no seu desempenho enquanto sistemas de libertação controlada. Todas as micropartículas foram caracterizadas e estudado o seu perfil de libertação a pH=1,2 e a pH=6,8.

3.1. Caracterização das micropartículas de quitosano

3.1.1. Morfologia e tamanho

A morfologia da superfície das micropartículas de quitosano produzidas foi analisada por SEM e as imagens obtidas são apresentadas nas Figura 3.1 a Figura 3.4 e Figura 3.8.

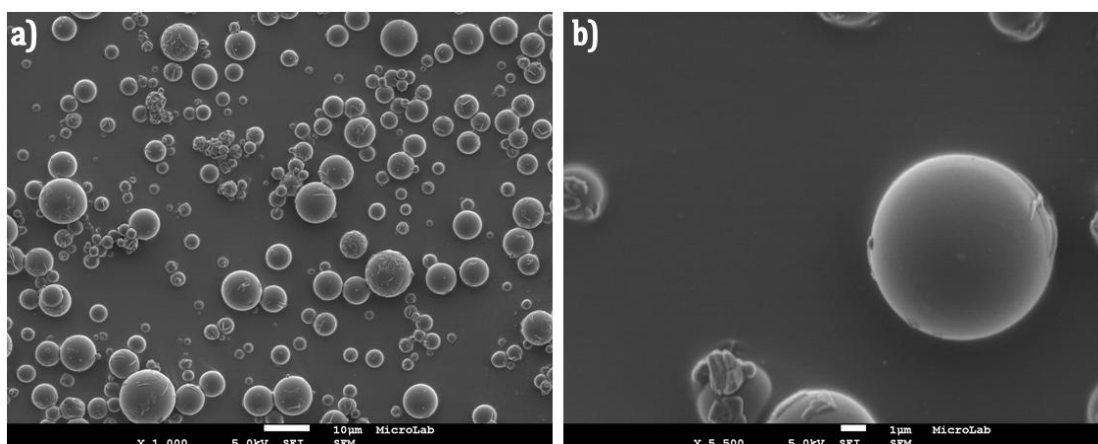


Figura 3.1 - Fotografias de micropartículas de quitosano com 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x

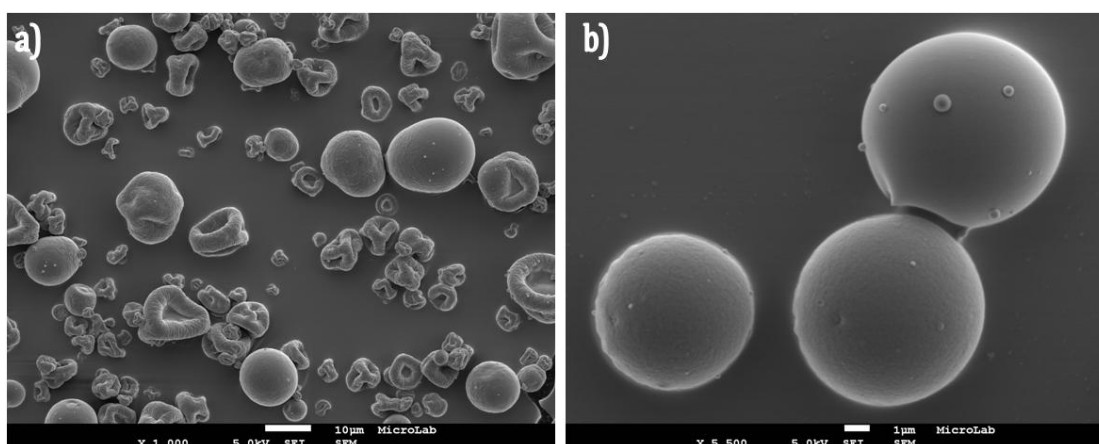


Figura 3.2 - Micropartículas de a) Q+AC, ampliação 1000x; b) Q+AG, ampliação 5500x.

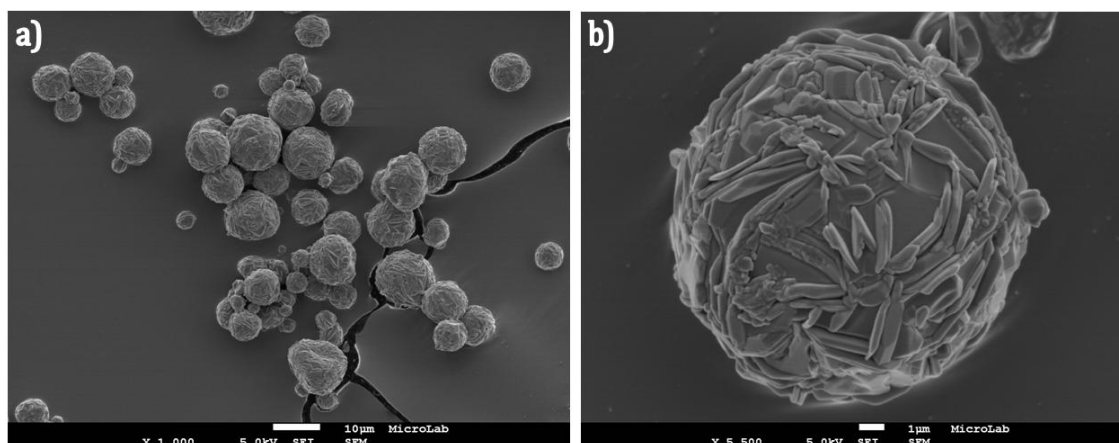


Figura 3.3 - Fotografias de micropartículas de quitosano com ácido glutâmico e 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x

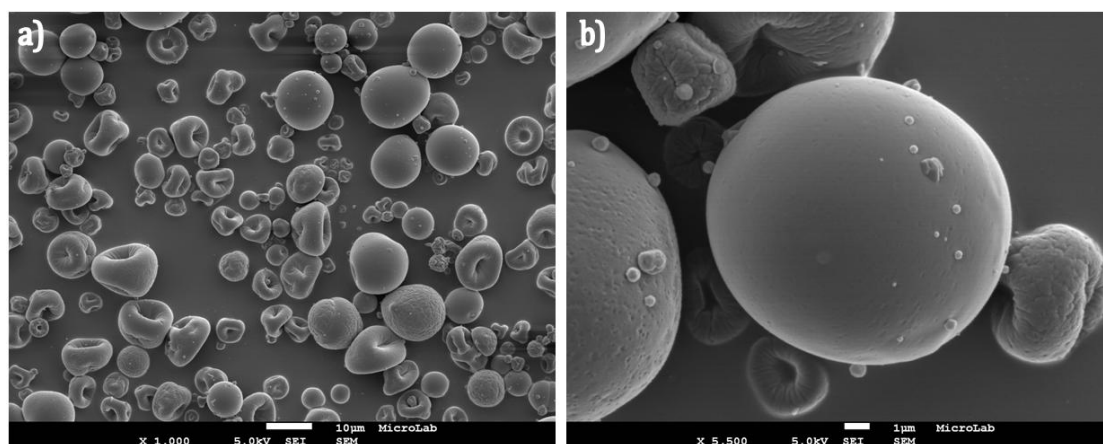


Figura 3.4 - Fotografias de micropartículas de quitosano com ácido cítrico e 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x.

Observando as figuras, verifica-se que as partículas de Q+5FU e Q+AC+5FU apresentam uma superfície bastante lisa. No entanto é possível observar irregularidades na superfície das micropartículas de Q+AG+5FU. Em relação à forma, as partículas de Q+5FU e Q+AG+5FU são esféricas enquanto que a maioria das micropartículas de Q+AC+5FU apresentam forma irregular, parecida com um *donut*

Na Figura 3.2 são apresentadas as imagens obtidas por SEM das micropartículas de Q+AG e Q+AC vazias para melhor análise da morfologia das partículas com fármaco. Pode-se observar que as micropartículas de Q+AG vazias, apresentam uma superfície lisa, enquanto que na presença de 5FU a superfície torna-se irregular. No caso das micropartículas de Q+AC, pode verificar-se que pode ser o ácido cítrico que confere propriedade morfológica do tipo *donut*.

Pode-se observar também uma partícula colapsada que indica que as partículas produzidas são ocas com uma parede de baixa espessura, devendo assim ser incluídas na categoria de cápsulas. Esta configuração é normalmente obtida em partículas produzidas por *spray-drying* e tem sido atribuída à migração das cadeias de polímero para o exterior da partícula que acompanha o movimento das moléculas de água durante o processo de secagem. [12]

Das fotografias obtidas por SEM é possível fazer uma análise da distribuição de tamanhos das micropartículas produzidas. Os resultados para as micropartículas de quitosano encontram-se representados nas Figura 3.5 a Figura 3.7 e Figura 3.9.

Na distribuição de tamanhos das micropartículas de Q+5FU, Figura 3.5 verifica-se que 47% das partículas apresentam tamanho entre 2µm e 4µm. O diâmetro médio para estas é de 4,6µm, pois apesar de quase metade pertencer ao intervalo 2-4µm, existem 40% de partículas que apresentam dimensão dos 4µm até aos 14µm.

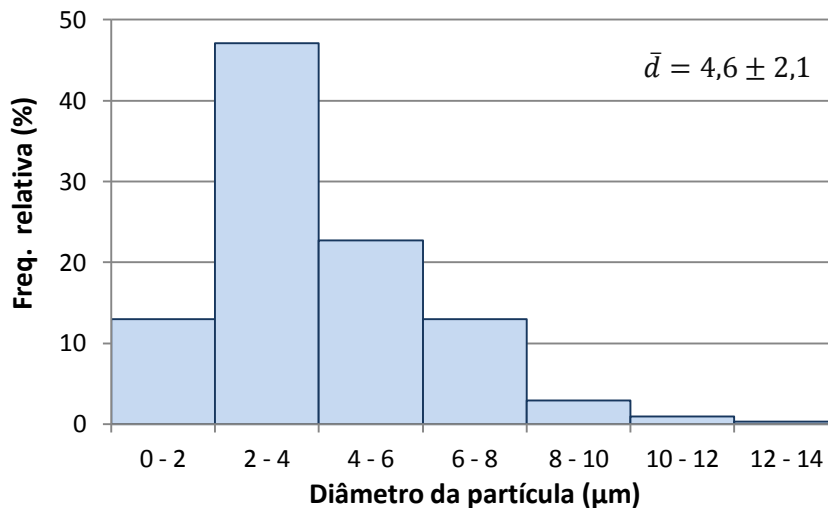


Figura 3.5 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+5FU

Quando se utiliza reticulante (Figuras 3.6 e 3.7) verifica-se que apesar da gama de tamanhos ser semelhante, o tamanho médio aumenta, sendo este efeito mais pronunciado quando se utiliza AC.

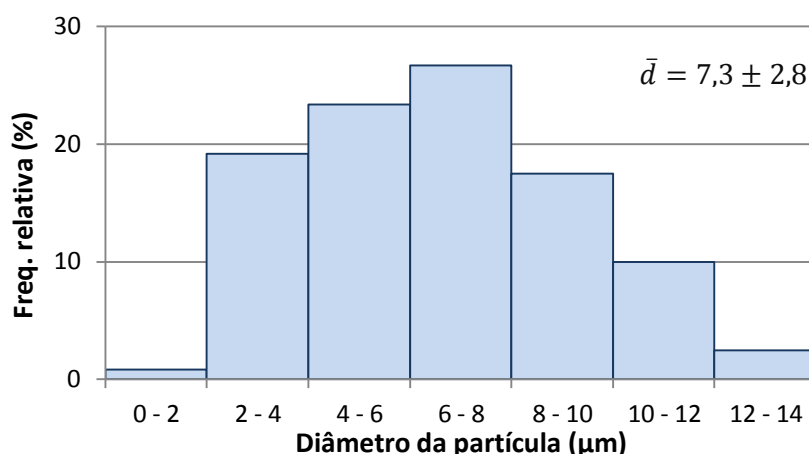


Figura 3.6 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+AG+5FU

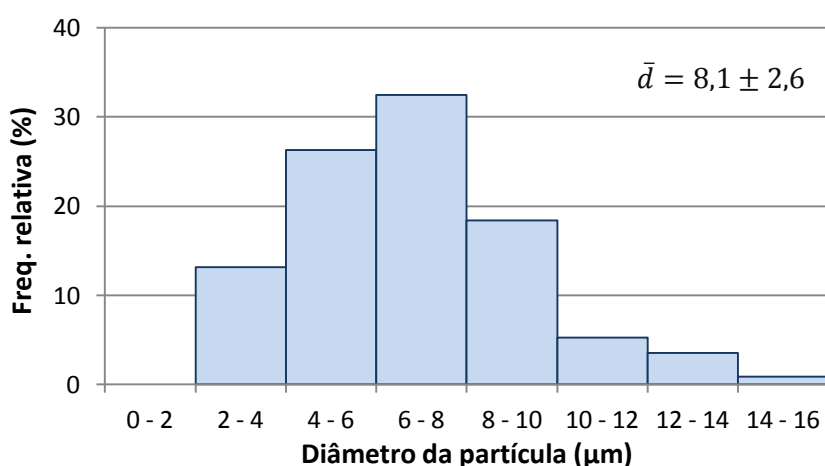


Figura 3.7 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+AC+5FU

Na Figura 3.8 estão apresentadas imagens de micropartículas de quitosano com Prednisolona obtidas com preparações diferentes antes da secagem no *spray-dryer*. Na preparação da solução das micropartículas da imagem b) foi adicionado etanol por forma a que ocorresse a dissolução da Prednisolona. Nas micropartículas da imagem a) a Prednisolona encontrava-se em suspensão, podendo observar-se os seus cristais no interior da micropartícula. Por esta razão decidiu-se utilizar apenas as micropartículas com a Prednisolona solubilizada (imagem b) nos ensaios posteriores. Estas últimas apresentam uma forma esférica com a superfície lisa.

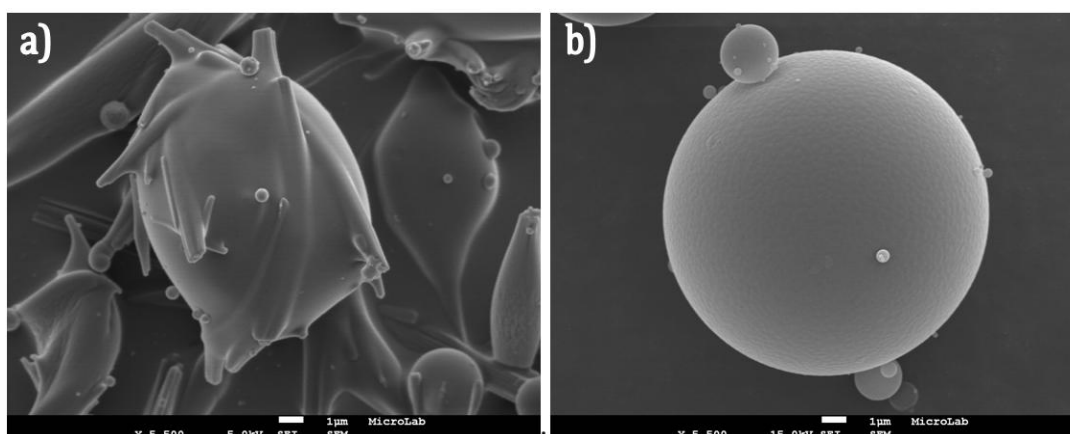


Figura 3.8 - Fotografia de micropartículas de quitosano com Prednisolona: a) Prednisolona em suspensão; b) Prednisolona solubilizada em etanol. Ampliação 5500x

A distribuição de tamanhos das micropartículas de Q+P, apresentada na Figura 3.9, apresenta uma banda alargada de tamanhos, sendo que 65,5% das partículas apresentam tamanho entre 2µm e 6µm, sendo o seu tamanho médio 5,8µm.

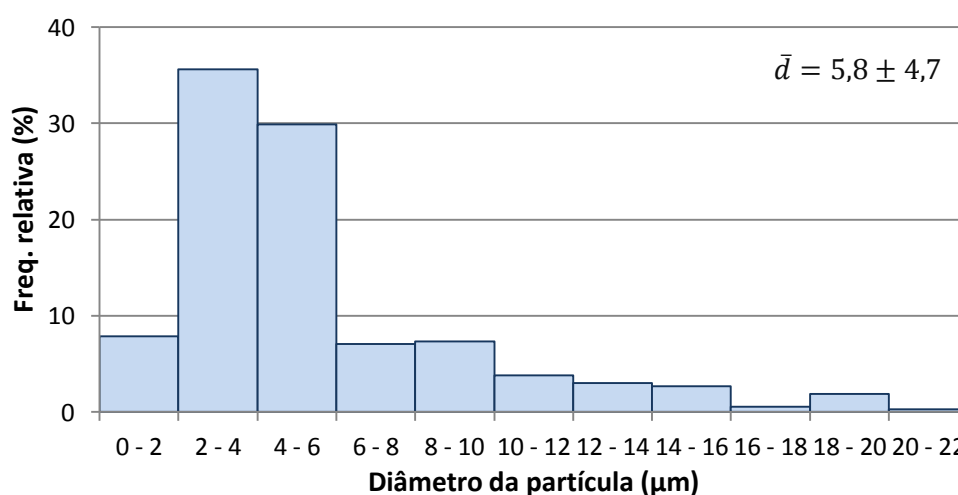


Figura 3.9 - Distribuição do tamanho das partículas de Q+P

Na seguinte Tabela 3.1 são apresentados os diâmetros das partículas de quitosano obtidos por análise da distribuição de tamanhos das fotografias de SEM das micropartículas de quitosano.

Tabela 3.1 - Diâmetro e desvio padrão das partículas de quitosano

Micropartículas	Tamanho médio (µm)	Desvio padrão (µm)
Quitosano	5,4	2,7
Q+AG	5,9	2,9
Q+AC	6,9	3,7
Q+5FU	4,6	2,1
Q+AG+5FU	7,3	2,8
Q+AC+5FU	8,1	2,6
Q+P	5,8	4,7

Todas as micropartículas produzidas com quitosano sofreram o mesmo processo de preparação, sendo que as diferenças morfológicas e de tamanho podem ser resultado apenas da composição das mesmas. Pode-se verificar que existe um aumento de tamanho médio quando é adicionado AG à composição das micropartículas e que este é superior quando há adição de AC.

3.1.2. Propriedades químicas

Os espectros FT-IR obtidos permitem a identificação dos compostos neles presentes, pois um espectro deste tipo funciona como uma impressão digital de cada composto permitindo assim este tipo de análise qualitativa.

Na Figura 3.10 apresentam-se os espectros das micropartículas de quitosano e do 5FU utilizados na produção das micropartículas Q+5FU, também representado o seu espectro na mesma figura.

Na curva de transmitância do quitosano pode-se observar uma larga banda centrada aos 3431cm^{-1} que está relacionada com a absorção das ligações de O-H, $-\text{NH}_2$ e N-H sobrepostas. As duas bandas presentes aos 2369cm^{-1} sugerem a presença de CO_2 , a razão para que tal aconteça pode ser devido a pequenas quantidades de dióxido de carbono podem ter ficado retidas na matriz de quitosano durante a atomização. A presença de ligações C-H está representada pela banda aos 1413cm^{-1} . A banda em 1070cm^{-1} é atribuída ao alongamento da ligação C-O. [48][49]

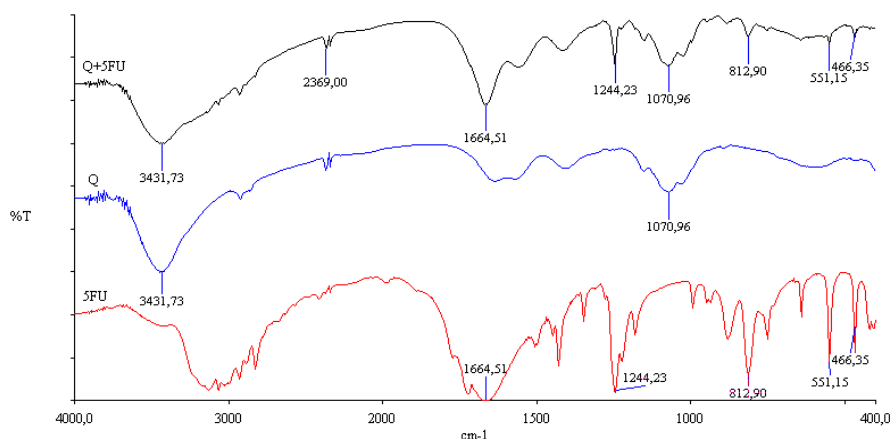


Figura 3.10 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+5FU, do quitosano e do 5FU

No espectro de infravermelho do 5FU as bandas de absorção características são as seguintes: 1664cm^{-1} , representa a sobreposição das vibrações de alongamento de $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$; 1428cm^{-1} , demonstra as ligações $\text{C}-\text{H}$ e $-\text{CF}=\text{CH}-$ no plano; 1244cm^{-1} corresponde à absorção da ligação $\text{C}-\text{N}$; 812cm^{-1} vibração de $\text{C}-\text{H}$ em $\text{CF}=\text{CH}-$ fora do plano.[48][49][50]

Analizando o espectro de infravermelho das micropartículas Q+5FU observa-se a banda centrada a 3431cm^{-1} que coincide com a do quitosano mas que neste caso apresenta um alargamento, resultado da presença de 5FU. Outra evidência da presença de 5FU são as bandas mais acentuadas a 1664cm^{-1} e a 1244cm^{-1} . A banda em 1070cm^{-1} e 1413cm^{-1} confirmam a presença do quitosano nestas micropartículas.

Verifica-se, no espectro das micropartículas Q+AG+5FU, Figura 3.11, a presença do quitosano pelas suas bandas características a 3439cm^{-1} , 1074cm^{-1} e algumas bandas típicas do *finger print* do 5FU aos 1660cm^{-1} , 1244cm^{-1} e abaixo dos 900cm^{-1} .

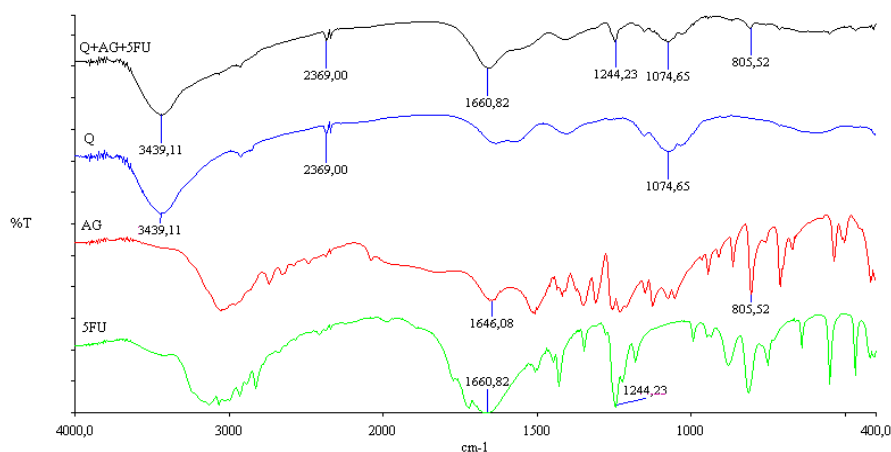


Figura 3.11 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+AG+5FU, do quitosano, do AG e do 5FU

O ácido glutâmico apresenta uma banda centrada a 3103cm^{-1} que representa a sobreposição de duas bandas correspondentes às ligações -NH_2 e O-H . A 1646cm^{-1} encontra-se a banda de absorção da ligação C=O . As bandas de 1500cm^{-1} a 400cm^{-1} fazem parte da *finger print* deste composto.

A única banda do espectro infravermelho das micropartículas de Q+AG+5FU que possa identificar a existência de AG nas micropartículas encontra-se a 805cm^{-1} , podendo no entanto estar sobreposta com a banda do 5FU, não sendo possível concluir sobre a presença de AG nas micropartículas a partir deste espectro.

Os espectros de infravermelho das micropartículas Q+AC+5FU e dos seus constituintes encontra-se na Figura 3.12.

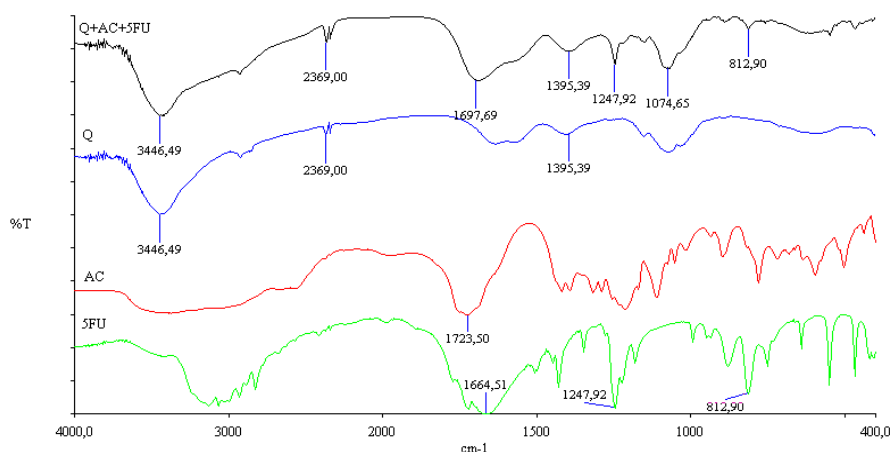


Figura 3.12 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+AC+5FU, do quitosano, do AC e do 5FU

No espectro do ácido cítrico observa-se uma banda a 1723cm^{-1} que representa a ligação carbonilo (C=O) presente nos três grupos carboxílicos que este possui. A banda larga de 2500cm^{-1} a 3700cm^{-1} é o resultado da sobreposição das bandas referentes às ligações O-H e C-H .

Para as micropartículas de Q+AC+5FU, o espectro de infravermelho releva o pico característico do quitosano a 3446cm^{-1} e, revelando a existência de 5FU nestas partículas, os picos a 1247cm^{-1} e 812cm^{-1} . Os picos a 1697cm^{-1} , 1395cm^{-1} e 1074cm^{-1} não são exactamente coincidentes com nenhum pico presente nos espectros dos compostos isolados que pertencem a estas micropartículas, o que revela que existiu reacção entre o quitosano e o ácido cítrico.

Na Figura 3.13 pode-se observar os espectros FT-IR das micropartículas de quitosano com Prednisolona, Q+P, e dos seus constituintes.

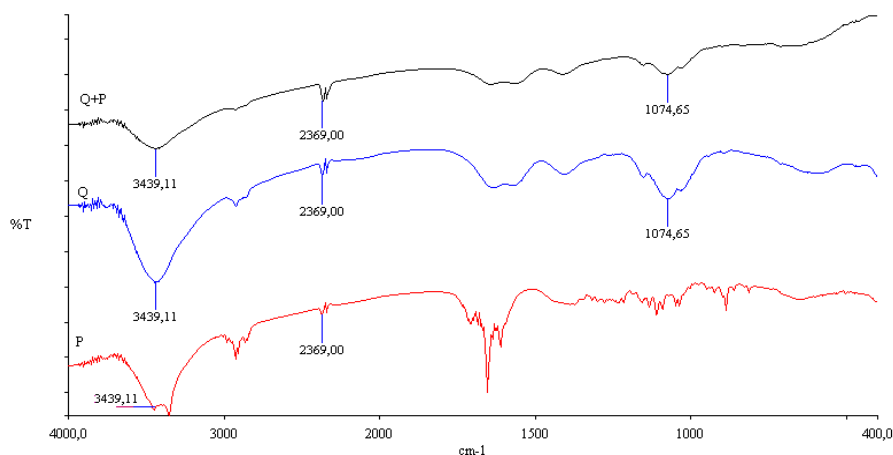


Figura 3.13 - Espectro FT-IR das micropartículas Q+P, do quitosano e da Prednisolona.

O espectro da Prednisolona mostra as suas bandas características: a banda entre 3200cm^{-1} e 3500cm^{-1} representa as ligações O-H; a banda intensa a 1708cm^{-1} e 1654cm^{-1} definem as ligações de alongamento de grupo carbonil (COOH) [51]

Neste caso existem duas observações a fazer, a primeira é que as bandas características da Prednisolona são coincidentes com as bandas características do quitosano, além disso, a Prednisolona encontra-se em muito pequena quantidade nas micropartículas Q+P, logo não se pode concluir sobre a presença de Prednisolona nas micropartículas Q+P a partir deste espectro.

3.1.3. Propriedades térmicas e cristalinidade

Difracção de raios-X (XRD)

De modo a averiguar se as micropartículas de quitosano se organizam em estruturas cristalinas, foram realizados ensaios de difracção de raios X (XRD) ao quitosano, aos fármacos, aos reticulantes e às micropartículas contendo fármaco.

Nas figuras seguintes encontram-se os difractogramas das micropartículas de quitosano, do 5FU e de partículas de Q+AG+5FU. O do ácido glutâmico encontra-se no Anexo 1 para melhor comparação e caracterização.

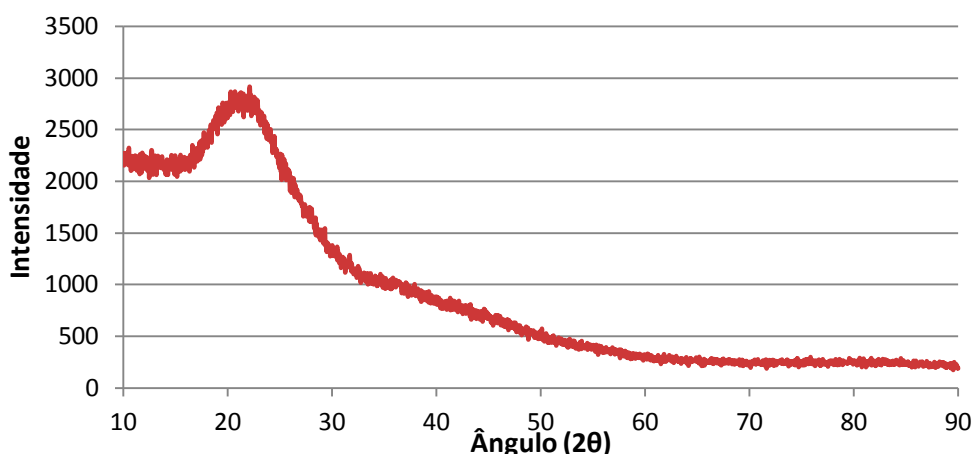


Figura 3.14 - Espectro XRD do Quitosano

O espectro de difracção de raios-X do quitosano mostra um pico proeminente aos 22°, característico do quitosano anidro.[52]

Na Figura 3.15 está representado o espectro de difracção de raios-X do 5FU.

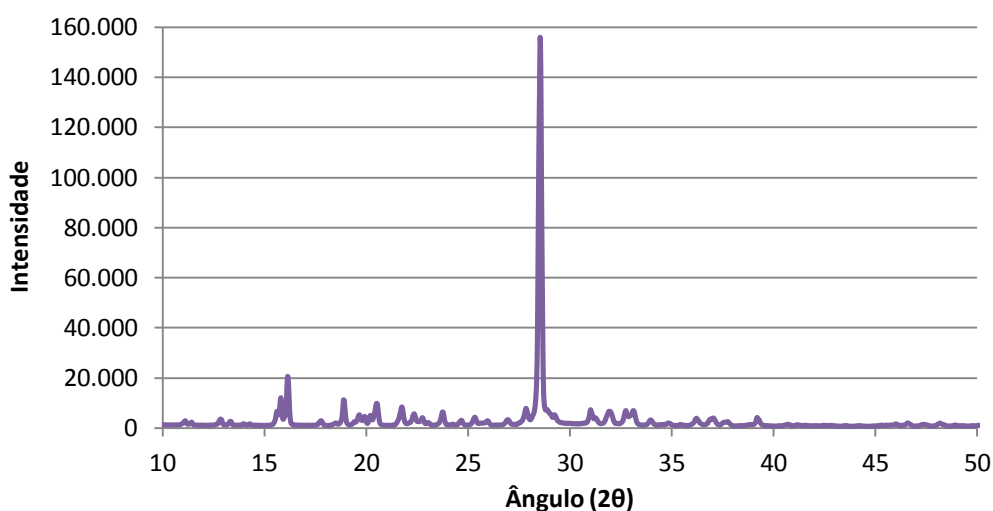


Figura 3.15 - Espectro XRD do 5FU

Na Figura 3.16 referente ao espectro de difracção de raios-X das micropartículas de Q+AG+5FU, pode-se observar os vários picos correspondentes à cristalinidade destas micropartículas. Analisando em detalhe pode-se associar alguns picos aos compostos presentes:

Picos de 5FU: 11,24°, 15,85°, 18,26°, 20,23°, 23,64°, 26,68°, 28,55°, 30,72°, 32,36°, 33,20°, 37,00° e 40,55°, visíveis na Figura 3.15.

Picos de AG: 20,23°, 28,55°, 33,20°, 38,65°, 40,55°. (pode-se encontrar o XRD do AG em Anexo 1)

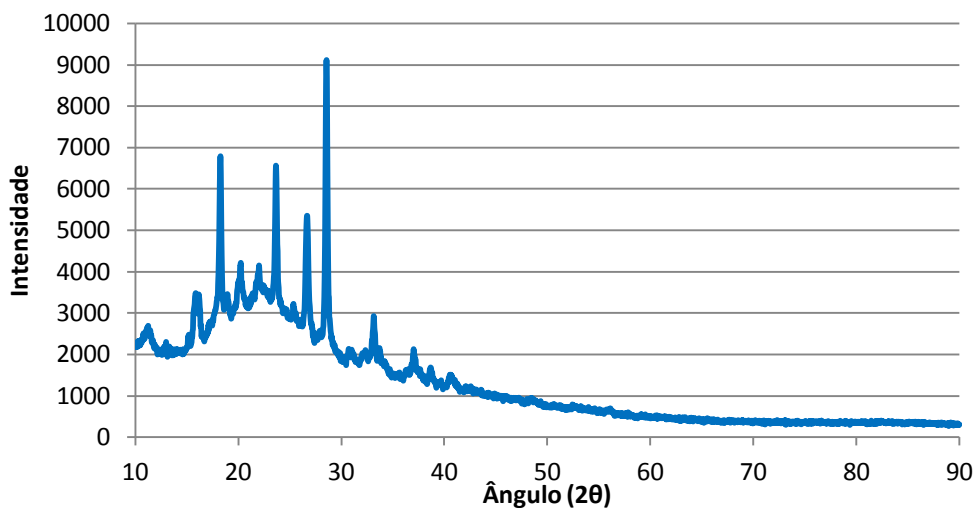


Figura 3.16 - Espectro XRD das micropartículas de Q+AG+5FU

Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A Figura 3.17 mostra os termogramas DSC das micropartículas de quitosano vazias, do ácido glutâmico, do fármaco 5FU e das micropartículas constituídas pelos 3 anteriores (Q+AG+5FU).

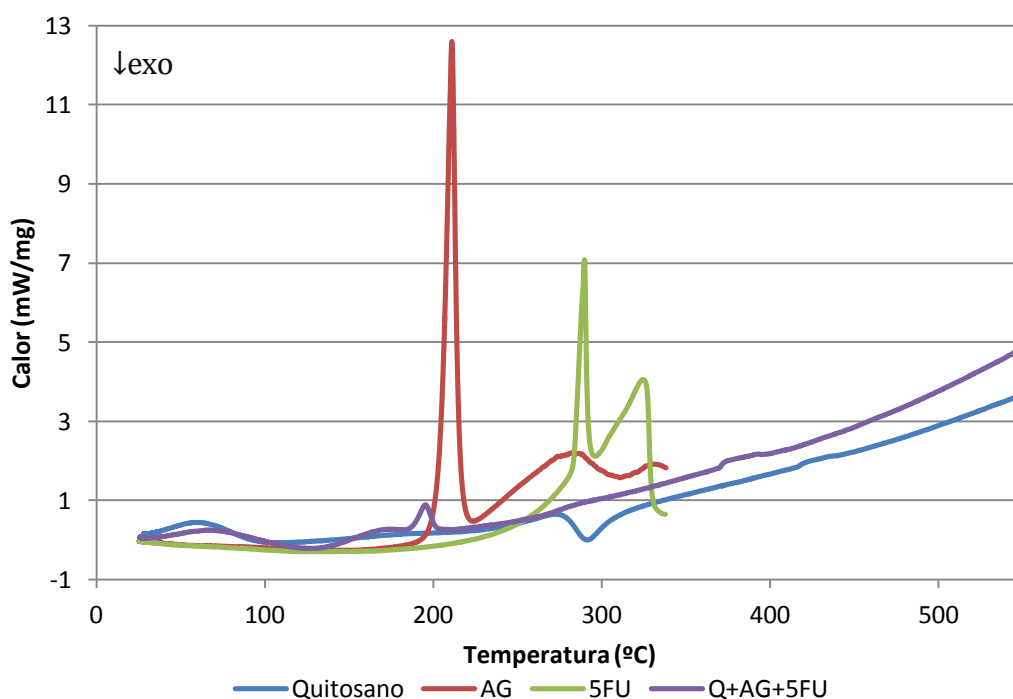


Figura 3.17 - DSC de quitosano, AG, 5FU e micropartículas de Q+AG+5FU

O termograma do quitosano puro apresenta um pico endotérmico aos 61,0°C e um pico exotérmico aos 292 °C. Uma vez que a 61°C ocorre uma perda de massa de cerca de 7,1% (visível nos resultados de termogravimetria em Anexo 2), este pico pode ser devido à evaporação de água e/ou ácido acético adsorvidos ao polímero. A 292 °C ocorre uma perda de massa de 41,6% o que evidencia a degradação do quitosano a esta temperatura.

Verifica-se que o 5FU puro apresenta um pico endotérmico, a 289,5°C, que corresponde à sua fusão, sendo o valor descrito na literatura de 282-283°C. [53][54][55] No entanto, não se observa este pico na curva correspondente às micropartículas com este fármaco (Q+AG+5FU), o que sugere que o fármaco não se encontra na forma cristalina mas molecularmente disperso na matriz polimérica.

O ácido glutâmico apresenta um pico endotérmico aos 210,7°C que coincide com a sua fusão. O termograma das micropartículas com fármaco (Q+AG+5FU) mostra um pico de baixa intensidade aos 196,0°C, o que pode indicar a existência de algum AG na forma cristalina nas micropartículas, possivelmente aquele que não reagiu com o quitosano no processo de reticulação. O facto de o pico se encontrar ligeiramente deslocado para a esquerda no DSC das micropartículas com fármaco pode indicar a existência de interações entre este e os restantes constituintes das micropartículas.

Comparando os resultados do XRD com DSC pode-se dizer que os picos no difractograma das micropartículas de Q+AG+5FU que foram associados com os picos do 5FU podem estar confundidos com os do AG, pois a possível alteração da estrutura cristalina do AG na mistura pode resultar num desvio dos picos no XRD, isto porque no DSC conclui-se que o mais provável é o 5FU se encontrar numa estrutura amorfa, disperso pela matriz.

3.1.4. Eficiência de encapsulação e carregamento de fármaco

A percentagem de fármacos nas micropartículas e a eficiência de encapsulamento determinadas recorrendo a espectrofotometria UV são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores de carregamento de fármaco e de eficiência de encapsulamento das micropartículas produzidas com quitosano

Micropartículas	Eficiência de encapsulamento (%)	Carregamento de fármaco (%) (m/m)
Q+5FU	29,4	6,8
Q+AG+5FU	41,5	6,9
Q+AC+5FU	40,6	6,7

Os resultados demonstrados para a eficiência de encapsulamento e carregamento de fármaco não são fiáveis, pois no momento da leitura do valor da absorvância este não era estável. Este acontecimento pode ser devido à presença de impurezas na amostra que não se conseguiram eliminar mesmo com a centrifugação e filtração. Para obtenção de melhores resultados a análise da concentração de fármaco poderia ser realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.2. Caracterização das micropartículas de FucoPol

3.2.1. Morfologia e tamanho

A morfologia da superfície das micropartículas de FucoPol produzidas foi analisada por SEM e as imagens obtidas são apresentadas nas Figura 3.18, Figura 3.19, Figura 3.20 e Figura 3.24.

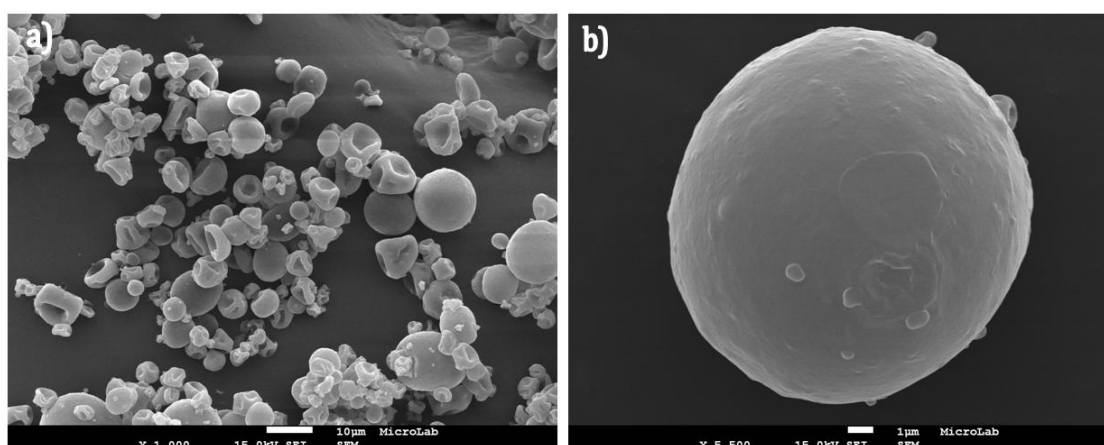


Figura 3.18 - Fotografia de micropartícula de FucoPol. Ampliação: a)1000x; b)5500x

Ao contrário das micropartículas de quitosano, a maioria das partículas de FucoPol não apresenta forma esférica. A sua superfície apresenta alguma rugosidade.

Na Figura 3.19 e Figura 3.20 encontram-se as fotografias obtidas por SEM das micropartículas de FucoPol carregadas com 5FU, sendo a última com o reticulante lisina. Nestas imagens pode-se observar que existe menos quantidade de micropartículas não esféricas que nas micropartículas sem fármaco e a superfície destas apresenta algumas irregularidades, sendo que as micropartículas sem lisina são mais rugosas.

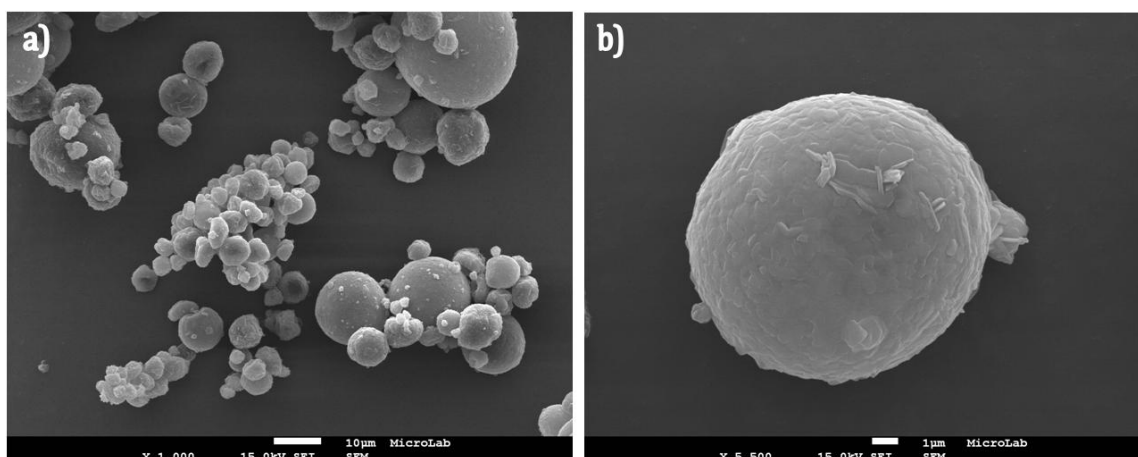


Figura 3.19 - Fotografia de micropartícula de FucoPol com 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x

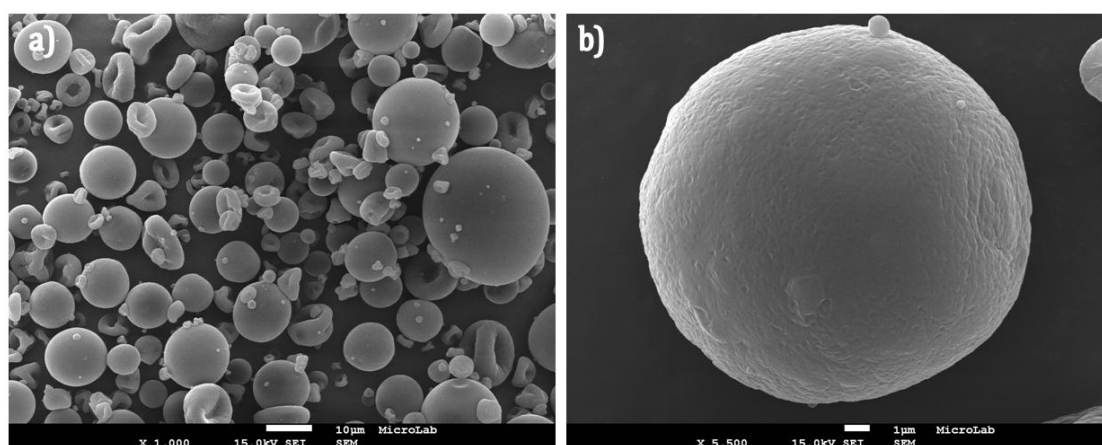


Figura 3.20 - Fotografia de micropartícula de FucoPol com lisina(50) e 5FU. Ampliação: a)1000x; b)5500x

A distribuição de tamanhos das micropartículas de EPS+5FU, apresentada na Figura 3.21, revela uma dominância das micropartículas de tamanho entre 4µm e 6µm (32%) e as micropartículas com maior dimensão não têm no máximo 18 µm. A Figura 3.22 mostra a distribuição de tamanhos das micropartículas EPS+Lis50+5FU, apresenta uma banda mais larga de tamanhos, em que 96% das micropartículas apresentam um tamanho entre 2µm e 14µm.

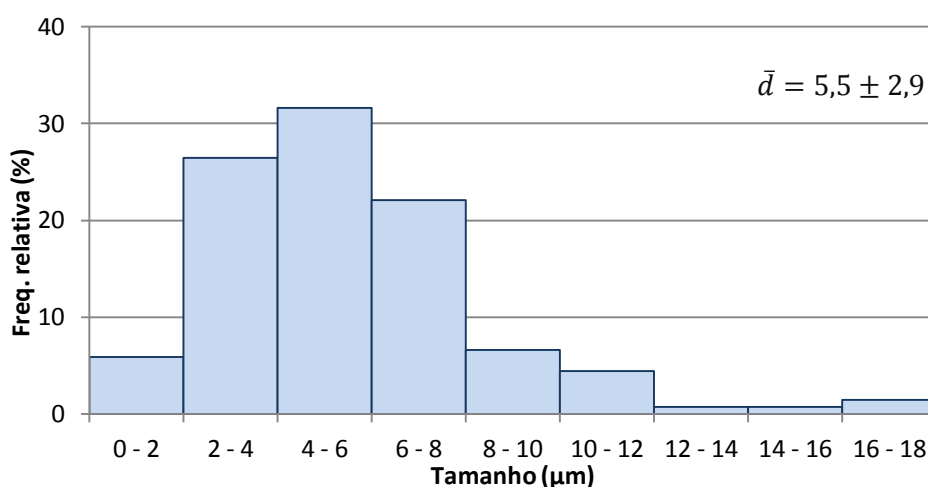


Figura 3.21 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+5FU

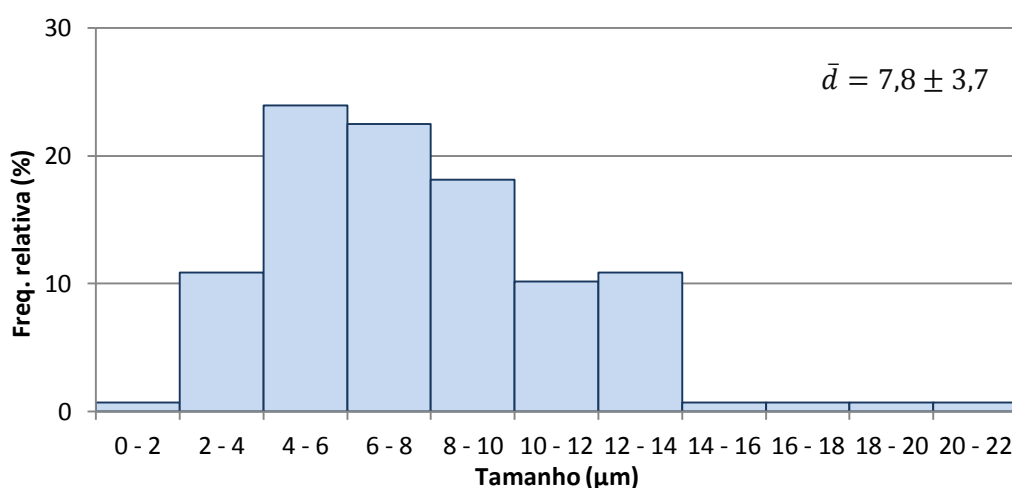


Figura 3.22 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+Lis50+5FU

Em relação às micropartículas de FucoPol com Prednisolona sem e com lisina, representadas na Figura 3.23 e Figura 3.24 respectivamente, verifica-se que não aparecem partículas em forma de *donut*, o que pode ser devido à presença da Prednisolona. Pode-se observar também que as partículas sem lisina continuam a apresentar uma superfície ligeiramente rugosa como as partículas de FucoPol analisadas anteriormente, enquanto que as micropartículas de EPS+Lis+P têm uma superfície lisa.

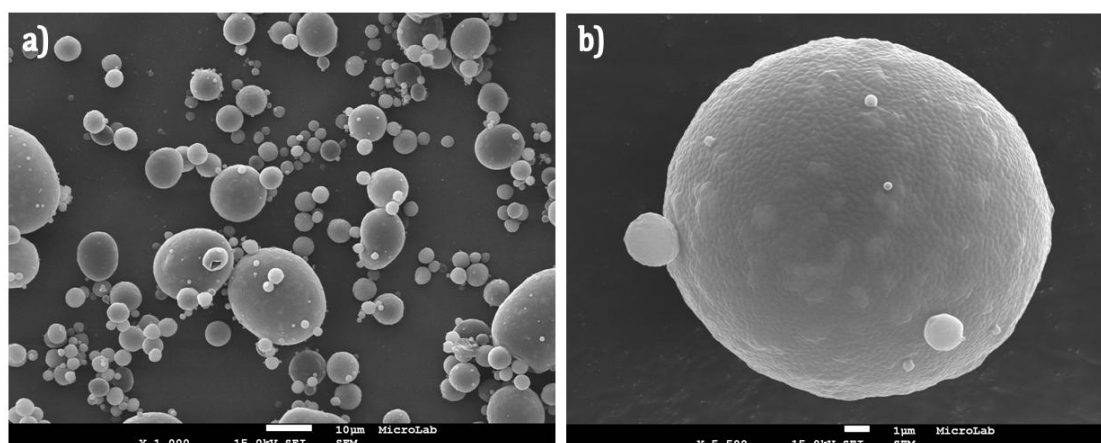


Figura 3.23 - Micropartícula de EPS com Prednisolona. Ampliação: a)1000x; b) 5500x

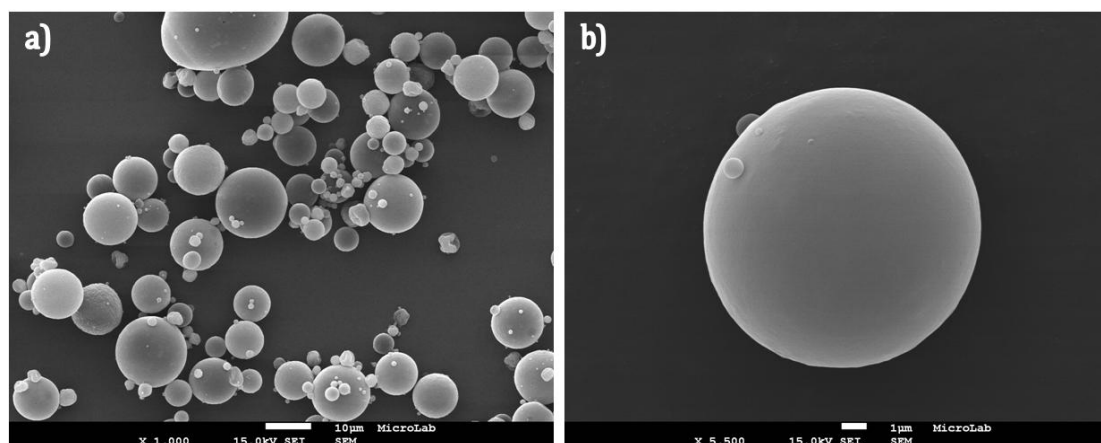


Figura 3.24 - Micropartícula de EPS com lisina(50) e Prednisolona. Ampliação: a)1000x; b)5500x

A distribuição de tamanho das micropartículas de FucoPol com Prednisolona e com EPS+Lis50+P são apresentadas nas Figura 3.25 e Figura 3.26, respectivamente.

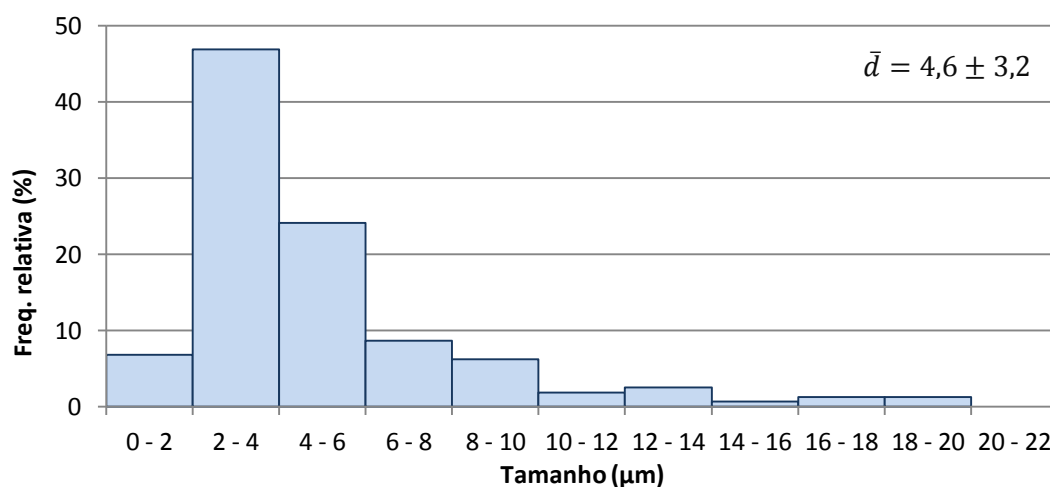


Figura 3.25 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+P

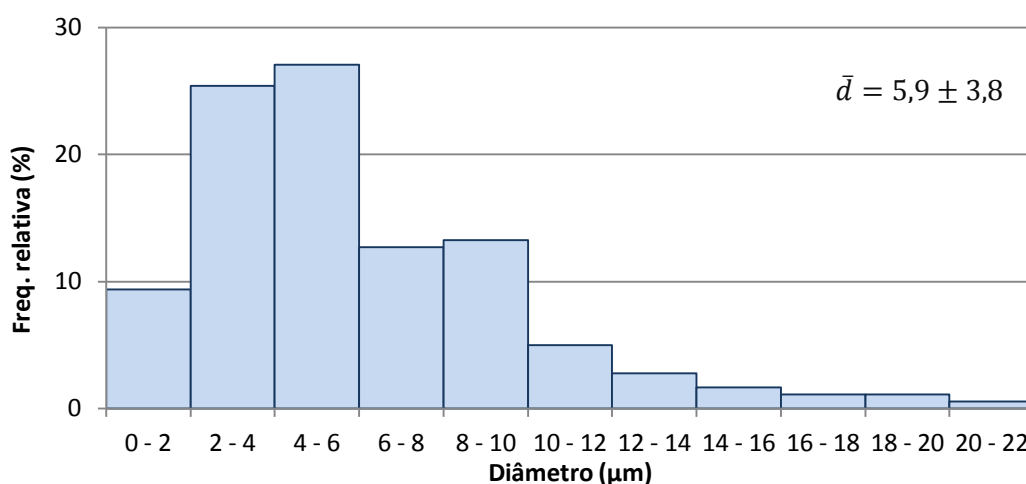


Figura 3.26 - Distribuição de tamanhos das partículas de EPS+Lis50+P

Ambas as distribuições apresentam uma gama larga de tamanhos. No entanto, as partículas de EPS+P apresentam uma maior frequência para tamanhos mais pequenos, cerca de 47% das micropartículas têm um tamanho entre 2μm e 4μm. Por outro lado, as partículas de EPS+Lis50+P apresentam um tamanho médio superior, sendo que 52% das micropartículas têm um tamanho entre 2μm e 6μm

Na Tabela 3.3 são apresentados os diâmetros das partículas de FucoPol obtidos por análise da distribuição de tamanhos das fotografias de SEM das micropartículas de quitosano.

Tabela 3.3 - Diâmetro e desvio padrão das partículas de EPS

Micropartículas	Tamanho médio (μm)	Desvio padrão
EPS	5,6	2,7
EPS+Lis50	8,3	5,3
EPS+5FU	5,5	2,9
EPS+Lis50+5FU	7,8	3,7
EPS+P	4,6	3,2
EPS+Lis50+P	5,9	3,8

À semelhança das micropartículas de quitosano, a adição do factor reticulante à composição das micropartículas representa um tamanho médio maior que as partículas compostas por apenas FucoPol.

3.2.2. Propriedades químicas

Para as micropartículas de FucoPol utilizaram-se os mesmos métodos para a sua caracterização que para as micropartículas de quitosano. Como tal, são apresentados os espectros FT-IR obtidos para as micropartículas de FucoPol nas Figura 3.27 a Figura 3.30.

O espectro infravermelho do polissacarídeo FucoPol pode ser observado na Figura 3.27 onde se podem ver a banda intensa a 3446cm^{-1} , comum a todos os polissacarídeos, e que representa as ligações O-H e a banda a 2922cm^{-1} caracteriza as ligações C-H dos grupos CH_2 . As ligações carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) dos grupos acilo estão representadas pela banda a 1635cm^{-1} . Entre 900cm^{-1} e 1200cm^{-1} encontram-se as bandas referentes às ligações glicosídicas C-O e C-C pertencentes à estrutura do FucoPol.[56]

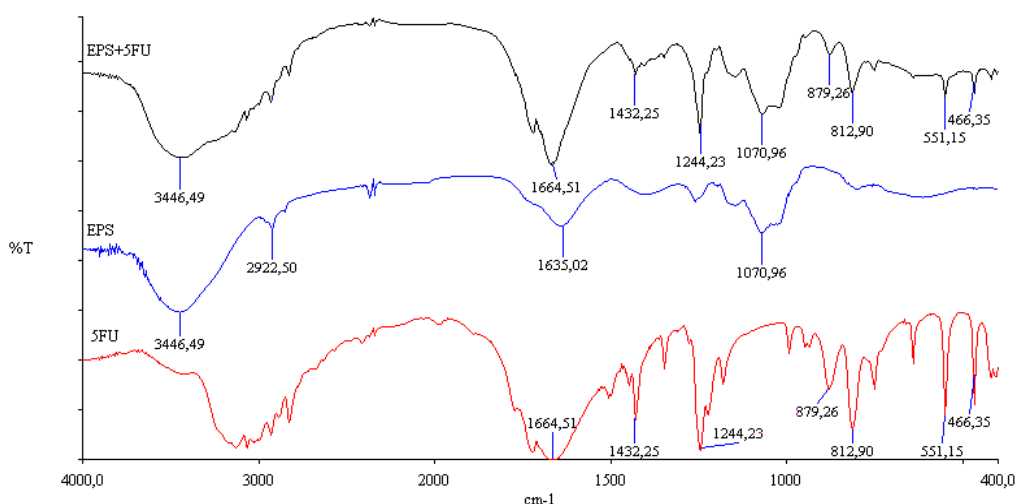


Figura 3.27 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+5FU, do EPS e do 5FU.

No espectro infravermelho referente às micropartículas produzidas de EPS+5FU, também visível na Figura 3.27, pode-se observar uma banda referente à presença de EPS a 3446cm^{-1} que apresenta um alargamento resultado da presença do 5FU. A proeminência da banda a 1664cm^{-1} também é devido à presença de 5FU, tal como os picos a 1244cm^{-1} , 879cm^{-1} , 812cm^{-1} , 551cm^{-1} e 466cm^{-1} . Outra banda que mostra a presença de EPS nas micropartículas encontra-se entre 900cm^{-1} e 1200cm^{-1} .

Na Figura 3.28 observam-se os espectros de infravermelho das micropartículas de EPS+Lis50+5FU, e dos seus constituintes.

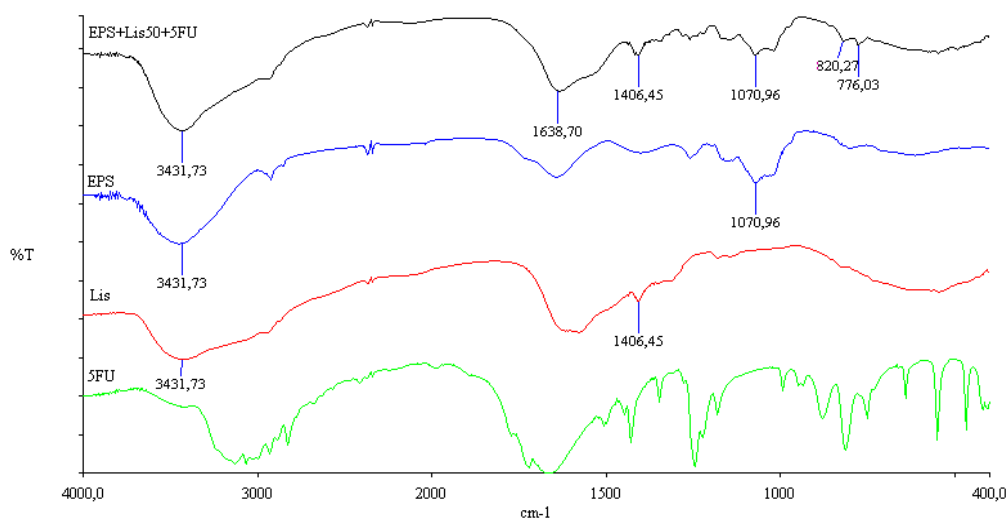


Figura 3.28 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+Lis50+5FU, do EPS, da Lis e do 5FU.

O espectro infravermelho da lisina apresenta uma banda larga de 3440cm^{-1} a 2990cm^{-1} está relacionada com a absorção das ligações de O-H, C-H e N-H sobrepostas. A vibração dos grupos -NH_2 sobreposta com a ligação C=O da lisina é representada pela banda de 1620cm^{-1} a 1640cm^{-1} . Outro pico a 1406cm^{-1} representa a ligação C-N. [49]

No espectro das micropartículas de EPS+Lis50+5FU são visíveis as bandas referentes ao EPS de 1070cm^{-1} a 1000cm^{-1} , a 3431cm^{-1} e 1638cm^{-1} , as duas últimas apresentam um alargamento devido à presença da lisina nas micropartículas. A banda a 1406cm^{-1} também demonstra a presença de lisina nestas micropartículas. Em relação ao 5FU não se pode concluir sobre a sua presença nas micropartículas de EPS+Lis50+5FU através da análise deste espectro de infravermelho.

Os espectros das micropartículas EPS+P e EPS+Lis50+P, representados nas Figura 3.29 e Figura 3.30, não revelam bandas específicas da lisina, no caso da EPS+Lis50+P, nem da Prednisolona, nos dois casos. Pode dever-se ao facto de todos os espectros revelarem bandas características coincidentes, ou seja, nos mesmos comprimentos de onda.

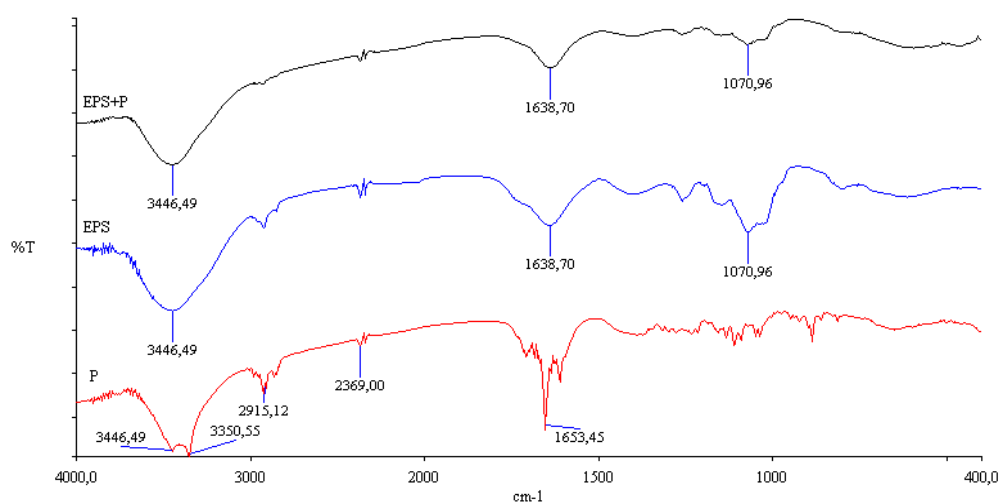


Figura 3.29 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+P, do EPS e da Prednisolona.

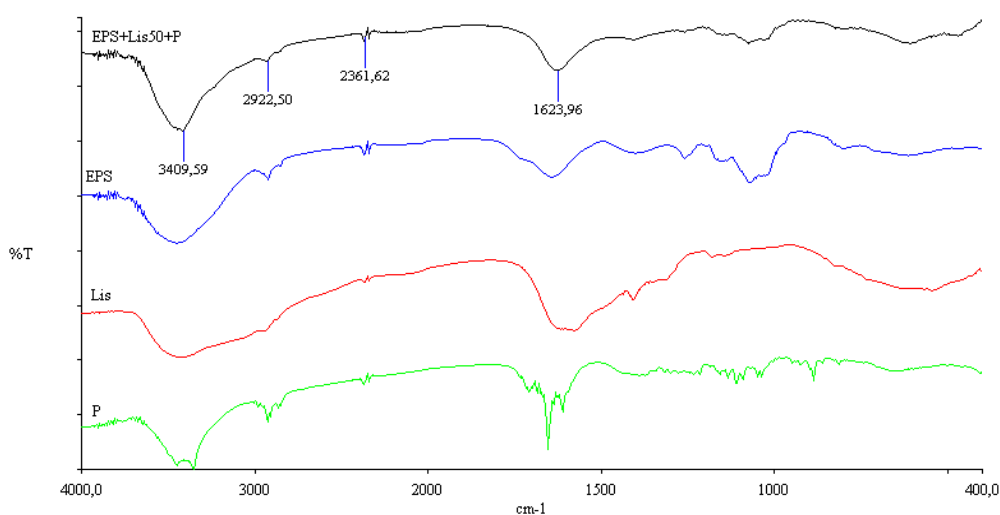


Figura 3.30 - Espectro FT-IR das micropartículas EPS+Lis50+P, do EPS, da Lis e da Prednisolona.

3.2.3. Propriedades térmicas e cristalinidade

Difracção de raios-X (XRD)

De modo a verificar a cristalinidade das micropartículas de FucoPol foi utilizada a técnica de difracção de raios-X (XRD). Nas figuras seguintes encontram-se os difractogramas das micropartículas de EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis50+P, assim como o do FucoPol para melhor comparação e caracterização.

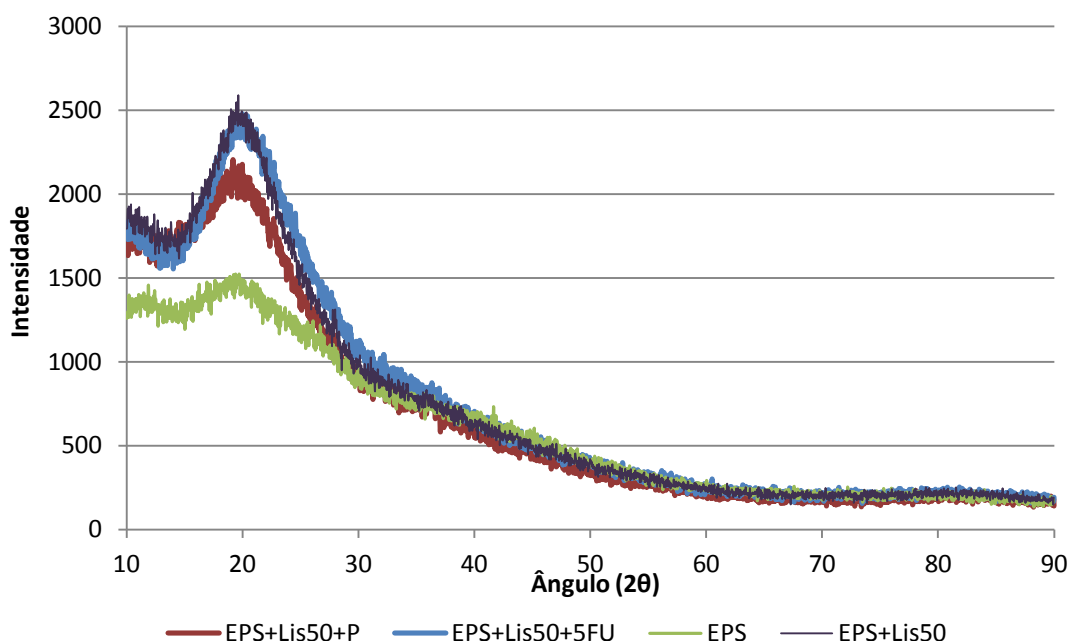


Figura 3.31 - Espectro XRD das micropartículas de EPS, EPS+Lis50, EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis50+P

Na Figura 3.31 pode observar-se que quer as micropartículas de EPS+Lis50+P quer as de EPS+Lis50+5FU apresentam uma estrutura essencialmente amorfa semelhante à apresentada pelas partículas sem fármacos o que indica que quer o 5-FU, quer a Prednisolona se encontram molecularmente dispersos na matriz polimérica. O 5FU e a Prednisolona são sólidos com elevada cristalinidade, o que se pode verificar nos seus XRD na Figura 3.15 e Anexo 3, respectivamente. No entanto, quando encapsulados em FucoPol não exibem nenhum dos seus picos característicos, o que sugere que se encontram completamente dispersos nesta matriz.

A Lisina também apresenta bastantes picos de elevada intensidade, visível no Anexo 4, que não se encontram presentes nestes difractogramas. Este caso pode significar que os constituintes das micropartículas carregadas com fármaco, sejam estes a lisina, o 5FU e a Prednisolona, não se encontram no seu estado cristalino.

Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A Figura 3.32 mostra os termogramas DSC das micropartículas vazias de FucoPol, da lisina, do fármaco 5FU e das micropartículas constituídas pelos três anteriores (EPS+Lis50+5FU).

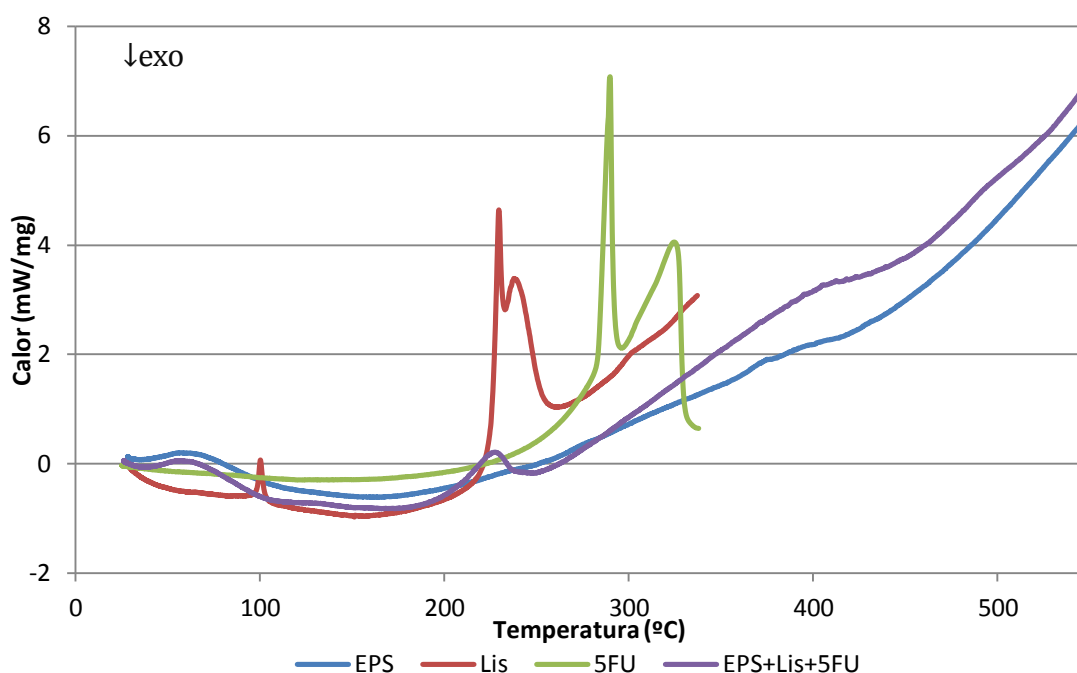


Figura 3.32 - DSC de EPS, Lis, 5FU e micropartículas de EPS+Lis+5FU

Os picos referentes ao 5FU, já referenciados anteriormente, no caso das micropartículas de EPS+Lis50+5FU também não se observam no termograma correspondente às micropartículas com este o que sugere que o fármaco se pode encontrar molecularmente disperso na matriz polimérica.

A lisina exibe dois picos endotérmicos, a 100,1°C e 229,6°C, o último corresponde à sua fusão. Pode-se observar, no termograma das micropartículas EPS+Lis50+5FU um pico endotérmico aos 228,0°C que pode ser referente à presença de lisina num estado cristalino. O facto de o valor de temperatura ser ligeiramente inferior pode dever-se à modificação da estrutura cristalina da lisina pela interacção desta com outros constituintes das micropartículas.

Na Figura 3.33, são apresentados os termogramas DSC das micropartículas vazias de EPS, da lisina, do fármaco prednisolona e das micropartículas constituídas pelos três anteriores (EPS+Lis50+P).

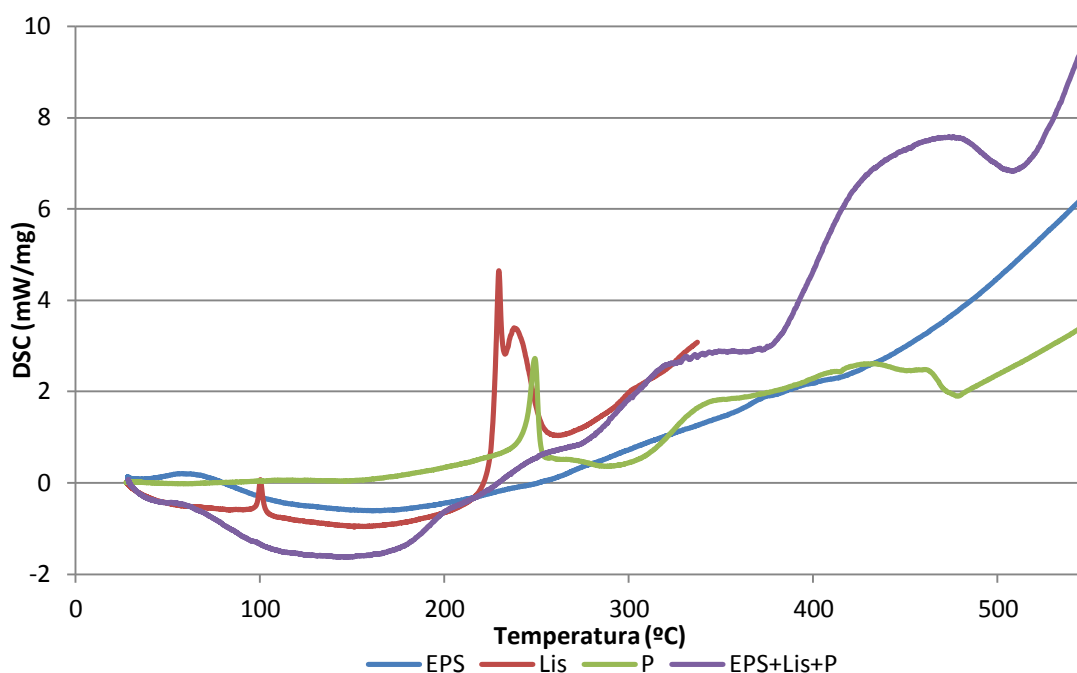


Figura 3.33 - DSC de EPS, Lis, Prednisolona e micropartículas de EPS+Lis+P

Analisando o DSC da Prednisolona observa-se um pico endotérmico aos 249,0°C correspondendo ao momento da sua fusão.

Não se observam no termograma correspondente às micropartículas nenhum pico de fusão o que sugere que nestas partículas não há moléculas na forma cristalina.

3.2.4. Eficiência de encapsulação e carregamento de fármaco

A percentagem de fármacos nas micropartículas e a eficiência de encapsulamento determinadas recorrendo a espectrofotometria UV são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Valores de carregamento de fármaco e de eficiência de encapsulamento das micropartículas produzidas com EPS

Micropartículas	Eficiência de encapsulamento (%)	Carregamento de fármaco (%) (mg/mg)
EPS+5FU	33,1	6,1
EPS+Lis100+5FU	49,5	6,5

Os resultados demonstrados para a eficiência de encapsulamento e carregamento de fármaco não são fiáveis, pois no momento da leitura do valor da absorvância este não era estável. Este acontecimento pode ser devido à presença de impurezas na amostra que não se conseguiram eliminar mesmo com a centrifugação e filtração. Para obtenção de melhores resultados a análise da concentração de fármaco poderia ser realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

3.3. Ensaios de Libertação *In vitro*

Seguidamente podem-se observar os perfis de libertação dos fármacos resultantes da libertação em meios que simulam as condições gastro-intestinais (pH=1,2 no estômago e pH=6,8 no intestino).

3.3.1. Libertação a partir de partículas de quitosano

Na Figura 3.34 pode-se observar o efeito da reticulação com AG e AC nas micropartículas de quitosano quando presentes numa solução de pH=1,2. As micropartículas que retêm maior quantidade fármaco após a libertação são as que contêm AG, e apenas atingem o patamar de equilíbrio 20 minutos após o início da libertação. As micropartículas reticuladas com AC atingem esse patamar ao fim de 6 minutos e as micropartículas sem reticulante atingem o equilíbrio a uma concentração de fármaco superior aos 6 minutos.

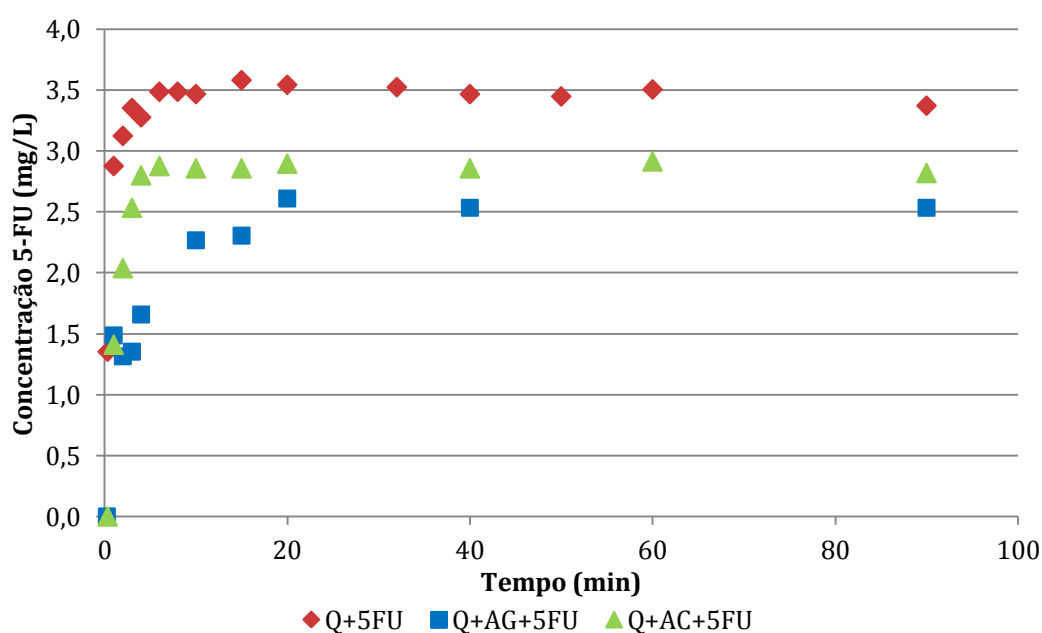


Figura 3.34 - Perfis de libertação de micropartículas de Q+5FU, Q+AG+5FU, Q+AC+5FU a pH=1,2

A este pH todos os grupos funcionais livres dos constituintes destas micropartículas encontram-se protonados. As micropartículas Q+AG+5FU podem reter mais fármaco porque o AG têm um grupo amina ($-NH_2$) que estando protonado e livre pode formar interações electroestáticas com o grupo carbonil ($C=O$) do 5FU enquanto que o AC não possui este grupo catiónico que pode prender o 5FU, mas apresenta três grupos ácido ($-COOH$) que reagem com os grupos amina ($-NH_2$) presentes no quitosano produzindo ligações cruzadas e dificultando a transferência do fármaco para o meio. [17] [57] As micropartículas Q+5FU apresentam uma libertação mais lenta que as Q+AC+5FU, pode ser resultado dos grupos amina do quitosano poderem ter interações electroestáticas com o 5FU, retendo-o, e na presença de AC estes grupos encontram-se ocupados também com os grupos ácido carboxílico do AC. Por outro lado, o AC livre que não reagiu, pode funcionar como plastificante da matriz polimérica, facilitando a transferência do fármaco.

Na Figura 3.35 encontram-se os perfis de libertação das micropartículas produzidas com quitosano a pH=6,8. Pode-se observar que as micropartículas com reticulante, AC ou AG, apresentam uma velocidade de libertação menor do que as micropartículas sem reticulante, o que seria de esperar. Entre as partículas com reticulante a velocidade de libertação é ligeiramente menor nas partículas que contêm AG, não sendo no entanto esta diferença significativa.

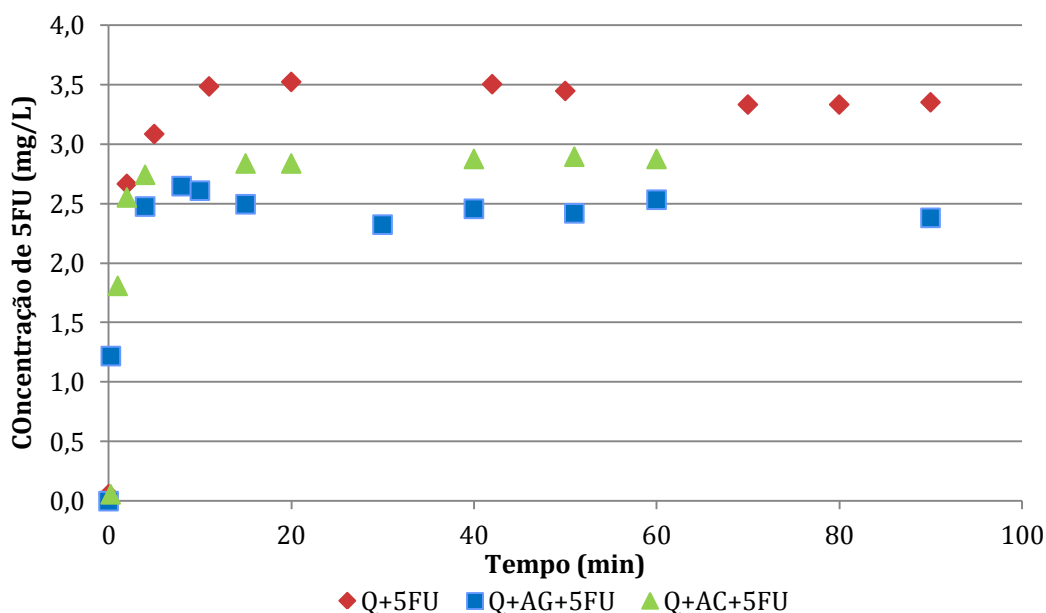


Figura 3.35 - Perfis de libertação de micropartículas de Q+5FU, Q+AG+5FU, Q+AC+5FU a pH=6,8

As micropartículas Q+AG+5FU apresentam um patamar de equilíbrio menor que as restantes micropartículas, ou seja, menor quantidade total de fármaco libertada. A este pH a matriz de quitosano possui uma carga praticamente neutra, logo a libertação é influenciada pela solubilidade do fármaco e os efeitos do AG e AC, quando presentes.[17] Este fenómeno pode ser explicado pela existência de cargas positivas nos grupos amina livres do ácido glutâmico que podem interagir com os grupos hidroxilo livres do quitosano e com os grupos cabonilo do 5FU já que a pH=6,8 o grupo amina do AG encontra-se protonado, pois o seu pKa é de 9,47.[58] No caso das micropartículas de Q+AC+5FU, sabe-se que existe reacção entre o quitosano e o AC que resulta em ligações covalentes entre as cadeias de quitosano ou a formação de grupos hidrofóbicos que fecham as cadeias poliméricas e dificultam a saída do fármaco, daí a libertação ser mais lenta. [28] No caso das micropartículas sem reticulante, Q+5FU, a concentração de equilíbrio é superior às anteriormente descritas porque não existem as interações acima descritas e o fármaco é libertado dependendo da sua solubilidade no meio.

Na Figura 3.36 apresentam-se os perfis de libertação das micropartículas de quitosano com o fármaco Prednisolona aos diferentes pH's.

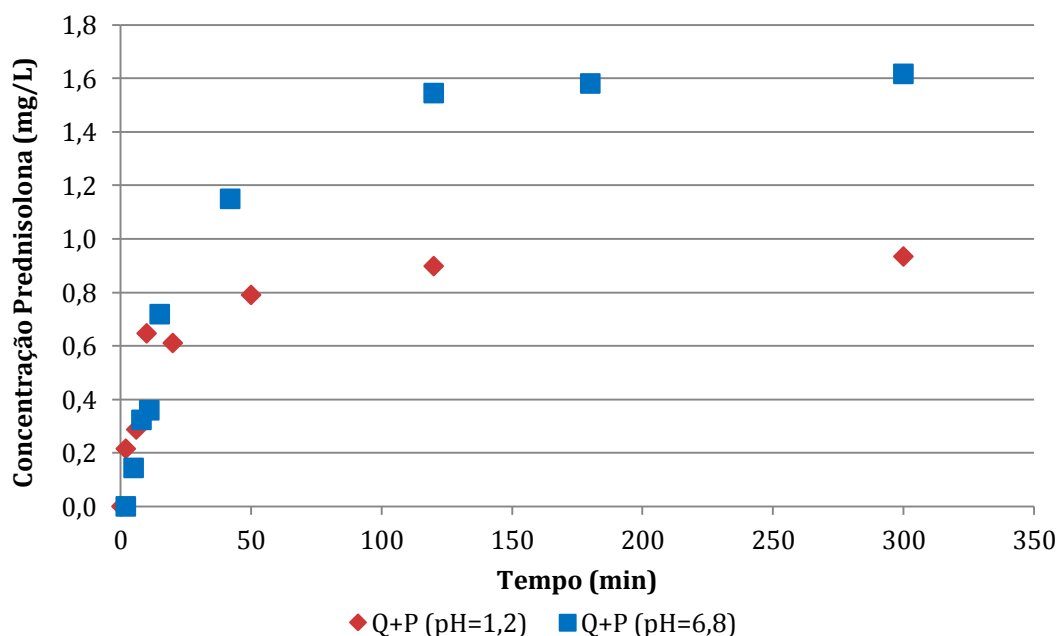


Figura 3.36 - Perfil de libertação das micropartículas de Q+P a pH=1,2 e pH=6,8.

Como se pode observar, a velocidade de libertação da Prednisolona das micropartículas de quitosano é superior quando estas se encontram a pH=6,8. Verifica-se também que se liberta uma menor quantidade de fármaco quando as micropartículas se encontram na solução de pH=1,2, mas a pH=6,8 aparentemente todo o fármaco é libertado.

Esta menor velocidade e quantidade final de fármaco libertada pode ser devido à protonação dos grupos amina (-NH₂) livres do quitosano que, com maior número de cargas positivas em meio ácido, podem formar interações electrostáticas com os grupos hidroxilo (-OH) da Prednisolona, que apresentam uma densidade de carga negativa nos átomos de oxigénio. [17] Em meio neutro (pH=6,8), o grau de protonação do quitosano é inferior, o que leva a uma menor densidade de cargas positivas na matriz polimérica e, consequentemente, a uma maior velocidade de difusão da Prednisolona e maior quantidade libertada no equilíbrio.

Na Tabela 3.5 estão apresentadas as velocidades iniciais de libertação para as micropartículas de Quitosano com 5FU e Prednisolona, calculadas da seguinte maneira:

$$\text{Velocidade de libertação} = \frac{\text{Concentração equilíbrio (mg/L)}}{\text{Momento atinge o equilíbrio (min)}}$$

Tabela 3.5 - Velocidade inicial de libertação de fármaco para partículas de quitosano

Micropartículas	Velocidade de libertação (mg/min)	Equilíbrio (min)
Q+5FU (pH=1,2)	0,58	6
Q+AG+5FU (pH=1,2)	0,13	20
Q+AC+5FU (pH=1,2)	0,48	6
Q+P (pH=1,2)	0,007	120
Q+5FU (pH=6,8)	0,32	11
Q+AG+5FU (pH=6,8)	0,62	4
Q+AC+5FU (pH=6,8)	0,09	30
Q+P (pH=6,8)	0,012	120

As libertações da Prednisolona são notoriamente mais lentas, o que pode ser devido à baixa solubilidade deste fármaco em meios aquosos.

Micropartículas com 5FU já foram estudadas diversas vezes. *Et al.* L. Huang, 2010, pode-se constatar nos ensaios de libertação de 5FU numa matriz de um complexo de quitosano e sulfato de condroitina, que o patamar de equilíbrio é atingido ao fim de cerca de 45 minutos a pH de 1,0 e 7,0, simulando as condições internas do estômago e do intestino. Este valor é um pouco superior aos resultados obtidos neste trabalho devido ao tipo de reticulação utilizada ser diferente em ambos.

3.3.2. Libertação a partir de partículas de FucoPol

Nas Figura 3.37 e Figura 3.38 estão apresentados os resultados dos ensaios de libertação das micropartículas de EPS contendo o fármaco 5FU realizados a pH=1,2 e pH=6,8, respectivamente. Para este fármaco verifica-se que a libertação mais lenta é das micropartículas reticuladas com lisina a 50% do peso de EPS (EPS+Lis50+5FU), que atinge o equilíbrio apenas ao fim de 20 minutos de libertação a pH=1,2 e 30 minutos a pH=6,8. As micropartículas não reticuladas atingem o patamar de equilíbrio 10 minutos após o início da libertação em ambos os meios de libertação (SGF e SIF) e as micropartículas EPS+Lis75+5FU revelam maior velocidade de libertação atingindo o patamar aos 3 minutos também nos dois meios de libertação. Os resultados das micropartículas EPS+Lis100+5FU não são representados, porque a libertação de 5FU é imediata.

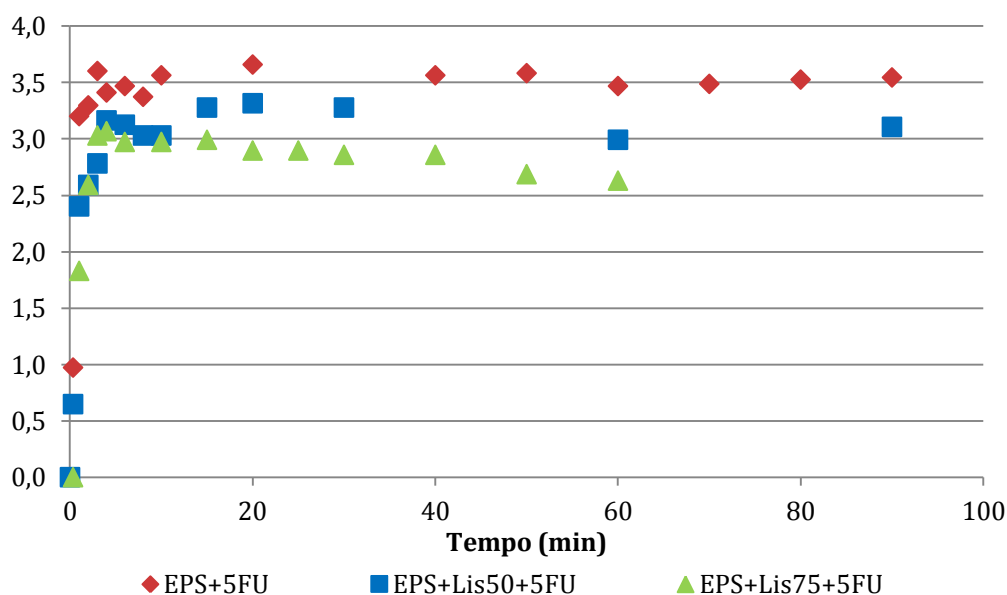


Figura 3.37 - Perfis de libertação de micropartículas de EPS+5FU, EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis75+5FU a pH=1,2

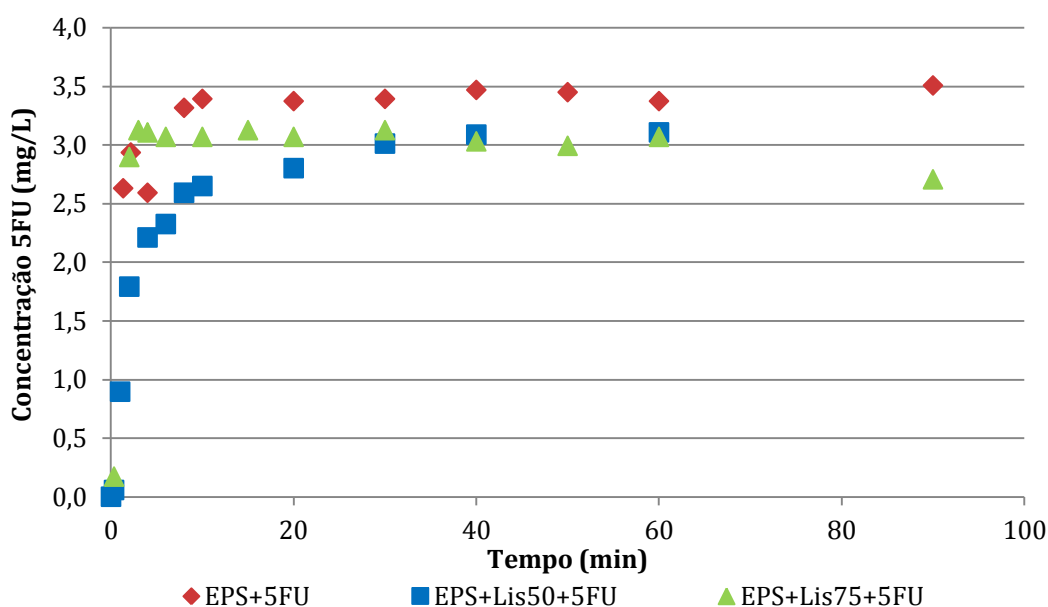


Figura 3.38 - Perfis de libertação de micropartículas de EPS+5FU, EPS+Lis50+5FU e EPS+Lis75+5FU a pH=6,8

Nas micropartículas de EPS com o fármaco 5FU, o pH não influencia os resultados, ou seja, o patamar de equilíbrio para as micropartículas EPS+Lis50+5FU é sempre atingido mais tarde do que para as restantes micropartículas. Quando se aumenta a concentração de lisina nas micropartículas para além dos 50% em peso de EPS, o patamar de equilíbrio é atingido mais rapidamente. Este resultado acontece porque a lisina pode ter dois efeitos sobre a matriz, efeito reticulante e efeito plastificante. O efeito reticulante da lisina é observado quando esta é adicionada até uma certa concentração, pois a libertação é mais retardada do que quando esta não se encontra presente na matriz. Quando a concentração de lisina é 75% e 100% da massa de EPS o efeito plastificante promove a libertação do fármaco. Além disso, o facto de existir maior quantidade de lisina entre o polissacarídeo cria um desempacotamento da rede polimérica e quanto maior a quantidade de lisina, maior a distância entre as moléculas de EPS e maior a difusão de fármaco e lisina, pois esta também pode ser libertada para o meio. Estes resultados demonstram que pode existir uma concentração óptima de lisina na matriz das micropartículas.

Relativamente ao pH, este mostra não ter efeito sobre os perfis de libertação porque ambos os grupos amina da lisina que possam estar livres encontram-se protonados aos pH's dos ensaios de libertação e a influência destes na matriz é semelhante qualquer que seja o pH do ensaio.[58]

Na Tabela 3.6 estão apresentadas as velocidades iniciais de libertação para as micropartículas de EPS com 5FU, calculadas da seguinte maneira:

$$Velocidade\ de\ libertação = \frac{Concentração\ equilíbrio(mg/L)}{Momento\ atinge\ o\ equilíbrio(min)}$$

Tabela 3.6 - Velocidade inicial de libertação de 5FU para partículas de EPS

Micropartículas	Velocidade de libertação (mg.L⁻¹.min⁻¹)	Equilíbrio (min)
EPS+5FU (pH=1,2)	0,36	10
EPS+Lis50+5FU (pH=1,2)	0,17	20
EPS+Lis75+5FU (pH=1,2)	1,01	3
EPS+Lis100+5FU (pH=1,2)	1,54	2
EPS+5FU (pH=6,8)	0,34	10
EPS+Lis50+5FU (pH=6,8)	0,10	30
EPS+ Lis75+5FU (pH=6,8)	1,04	3
EPS+ Lis100+5FU (pH=6,8)	1,44	2

Os perfis de libertação das micropartículas de EPS carregadas com Prednisolona estão representados nas Figura 3.39 e Figura 3.40, a pH=1,2 e pH=6,8, respectivamente. Os resultados destes ensaios foram normalizados de forma a que fosse mais fácil a sua compreensão e comparação. A normalização foi feita pela razão da concentração no momento t , Q_t , pela concentração atingida no equilíbrio, Q_{eq} . A pH=1,2, verifica-se que a velocidade de libertação é maior nas partículas que contêm lisina, quer 25% (p/p) quer 75% (p/p), o que não seria de esperar. Neste caso, o efeito plastificante da lisina parece sobrepor-se ao efeito reticulante.

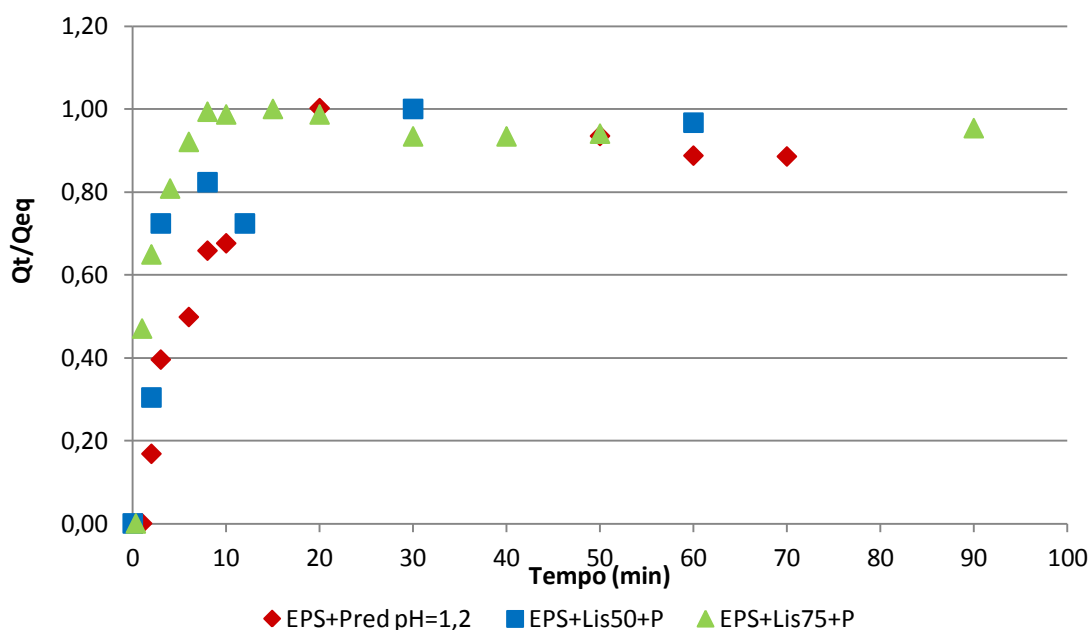


Figura 3.39 - Perfis de libertação de micropartículas de EPS+P, EPS+Lis50+P e EPS+Lis75+P a pH=1,2

A pH 6,8, verifica-se que a libertação da Prednisolona é mais lenta nas micropartículas reticuladas relativamente às não reticuladas, como era de esperar. Relativamente ao aumento da concentração de lisina, o efeito é semelhante ao observado para o 5-FU (Figura 3.38) mas sendo o seu efeito plastificante para concentrações de lisina superiores a 50% da massa muito mais intenso no caso da Prednisolona.

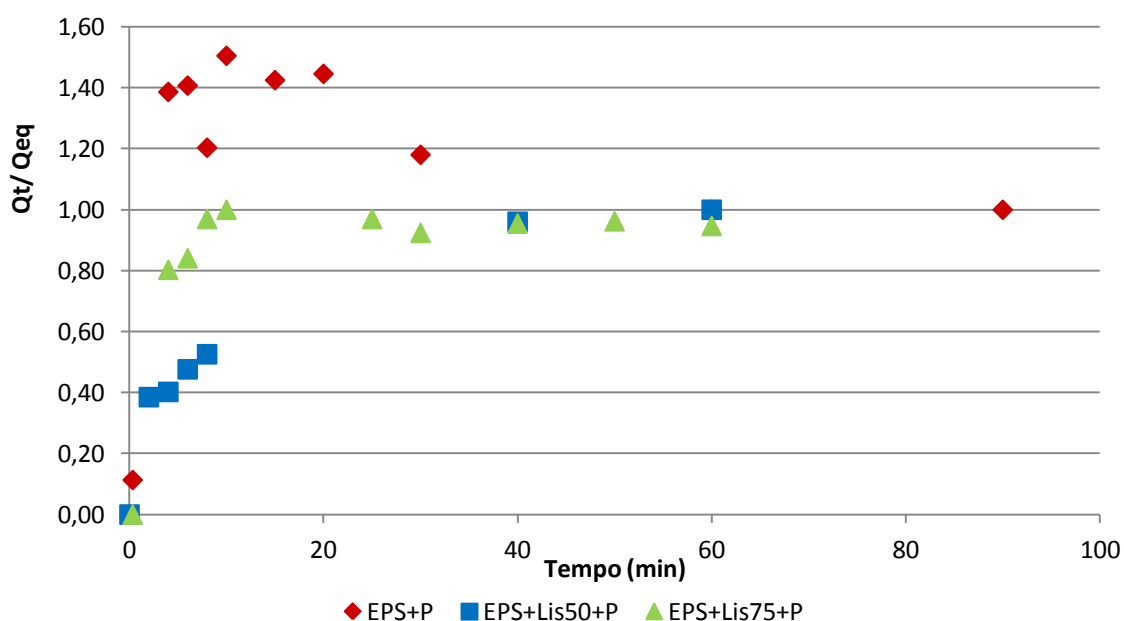


Figura 3.40 - Perfis de libertação de micropartículas de EPS+P, EPS+Lis50+P e EPS+Lis75+P a pH=6,8

Na Tabela 3.7 estão apresentadas as velocidades iniciais de libertação para as micropartículas de EPS com Prednisolona, calculadas da seguinte maneira:

$$Velocidade\ de\ libertação = \frac{Concentração\ equilíbrio(mg/L)}{Momento\ atinge\ o\ equilíbrio(min)}$$

Tabela 3.7 - Velocidade inicial de libertação de Prednisolona para partículas de EPS

Micropartículas	Velocidade de libertação (mg/min)	Equilíbrio (min)
EPS+P (pH=1,2)	0,08	20
EPS+Lis50+P (pH=1,2)	0,02	30
EPS+Lis75+P (pH=1,2)	0,83	6
EPS+Lis100+P (pH=1,2)	2,84	2
EPS+P (pH=6,8)	0,48	4
EPS+Lis50+P (pH=6,8)	0,03	40
EPS+ Lis75+P (pH=6,8)	0,58	8
EPS+ Lis100+P (pH=6,8)	0,24	3

3.4. Modelos cinéticos

Neste trabalho foi aplicado o modelo cinético de Korsmeyer-Peppas a alguns perfis de libertação, os parâmetros n e K_k do modelo foram calculados por ajuste dos valores no Excel.

Os perfis de libertação obtidos neste trabalho apresentam libertações rápidas dos fármacos, como tal, só foi aplicado o modelo cinético nas libertações das micropartículas de EPS+Lis50+5FU a pH=6,8 e de EPS+Lis50+P a pH=6,8, representados na Figura 3.41 e 3.42, respectivamente, para os valores de libertação <60%.

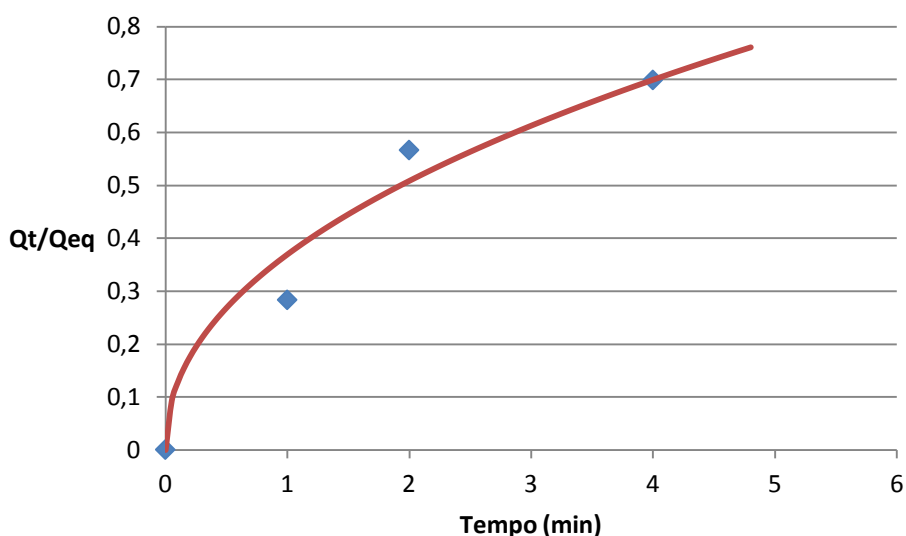


Figura 3.41 - Modelação cinética do perfil de libertação de EPS+Lis50+5FU a pH=6,8

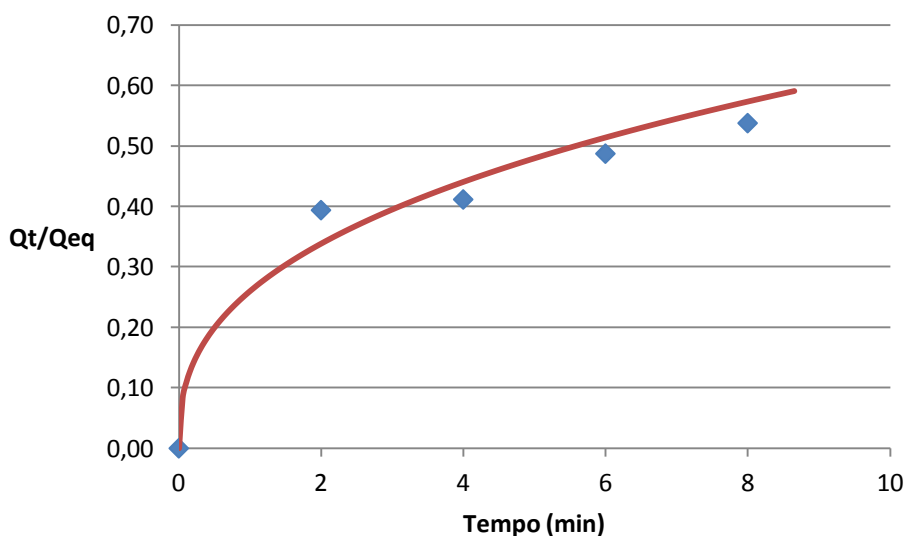


Figura 3.42 - Modelação cinética do perfil de libertação de EPS+Lis50+P a pH=6,8

Foram obtidos os valores para os seguintes valores dos parâmetros da equação de Korsmeyer-Peppas: $n=0,46$ e $K_k=0,37$ na libertação de 5FU presente nas micropartículas de EPS+Lis50+5FU; e $n=0,38$ e $K_k=0,26$ na libertação da Prednisolona nas micropartículas EPS+Lis50+P. Pela interpretação do expoente “n” na equação, significa que o processo de libertação se dá por difusão do fármaco através da matriz polimérica nos primeiros minutos da libertação.

Devido à velocidade de libertação dos fármacos nas matrizes estudadas ser elevada, existem poucos pontos experimentais para os valores de libertação menores que 60%. Significa que existe um grande erro associado a esta aproximação pelo modelo cinético de Korsmeyer-Peppas.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Conclusões

4. Conclusões

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Conclusões

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o processo de libertação de fármaco e seleccionar o sistema fármaco/polímero mais adequado para a libertação no estômago ou no intestino. Para tal efectuou-se a microencapsulação por *spray-drying* de dois fármacos, o 5-Fluorouracil e a Prednisolona, em diferentes matrizes, nomeadamente: quitosano; quitosano reticulado com ácido glutâmico; quitosano modificado com ácido cítrico; FucoPol e FucoPol com lisina a diferentes concentrações na matriz. É de salientar a produção de micropartículas com o FucoPol produzido, pois trata-se de um polímero inovador nesta aplicação e foi com sucesso que se realizaram todos os ensaios de produção destas micropartículas, podendo ser mais explorado.

As micropartículas contendo os vários compostos em estudo foram caracterizadas relativamente à sua morfologia, tamanho, propriedades químicas, propriedades térmicas cristalinidade e eficiência de encapsulação.

Os resultados obtidos por SEM mostraram que todas micropartículas produzidas com quitosano apresentam uma forma esférica, excepto quando é adicionado ácido cítrico, que apresentam uma morfologia irregular tipo *donut*, e quando está em simultâneo o ácido glutâmico e o 5-Fluorouracil apresentam irregularidades nas esferas. Verificou-se que existe um aumento de tamanho médio quando é adicionado ácido glutâmico à composição de qualquer tipo de micropartículas, com ou sem fármaco, e que este aumento é superior quando há adição de ácido cítrico. Nas micropartículas de FucoPol verificou-se que estas apresentam uma morfologia irregular, excepto na presença da Prednisolona em que adquirem uma forma esférica. Em relação às suas dimensões, estas revelam um tamanho médio superior na presença de lisina na sua composição.

Da análise de difracção de raios-X, verificou-se que as micropartículas Q+AG+5FU apresentam um composto com cristalinidade, que poderá ser atribuída ao ácido glutâmico. Umavez que a análise de calorimetria diferencial de varrimento destas micropartículas mostrou a existência um único pico endotérmico, perto da temperatura de fusão do ácido glutâmico, o que indica que este se encontra na sua forma cristalina nas micropartículas enquanto que o 5-Fluorouracil se encontra molecularmente disperso na matriz polimérica. Relativamente às micropartículas de FucoPol verificou-se que na análise das micopartículas de EPS+Lis50+P, quer por difracção de raios-X quer por calorimetria diferencial de varrimento, não existe qualquer composto na forma cristalina, ou seja, a Prednisolona

encontra-se molecularmente dispersa na matriz polimérica. Já nas análises às micropartículas de EPS+Lis50+5FU, o termograma apresentou um pico endotérmico que pode ser referente à presença de lisina num estado cristalino, mas que não é visível no seu difractograma.

De maneira a analisar a capacidade de reticulação dos compostos utilizados para o efeito, efectuaram-se ensaios de libertação a pH=1,2, simulando o suco gástrico, e a pH=6,8, simulando o suco intestinal.

Em geral as libertações de todos os fármacos foram rápidas, tem-se obtido uma libertação de fármaco em menos de duas horas. As micropartículas de quitosano com Prednisolona, que demoraram duas horas a atingir o equilíbrio nos meios de libertação, foram as que demoraram mais tempo a atingir o equilíbrio. As micropartículas de quitosano com o fármaco 5-Fluorouracil apresentaram velocidades de libertação superior, sendo que a pH=1,2 o melhor reticulante é o ácido glutâmico, pois apresenta uma velocidade de libertação menor, mas mesmo assim o patamar de equilíbrio é atingido logo 20 minutos após o início da libertação. Para os ensaios de libertação realizados a pH=6,8 o melhor reticulante revelou ser também o ácido glutâmico. Apesar de a concentração de fármaco no equilíbrio, com o ácido cítrico, ser um pouco superior à das micropartículas reticuladas com ácido glutâmico, a diferença não é significativa.

No caso do FucoPol, a lisina mostrou ter, em geral, o efeito de retardar a libertação de 5FU tanto em meio ácido como em meio neutro sendo mais pronunciado quando em meio neutro. Este efeito é, no entanto, dependente da concentração de lisina nas micropartículas. Em meio ácido a velocidade de libertação é menor na presença de lisina mas, não se observam diferenças significativas nos perfis de libertação de 5FU de micropartículas com 50% de lisina e com 75% de lisina. Em meio neutro o efeito da diminuição evidente da velocidade em partículas com 50% de lisina parece ser anulado para partículas com 75 % de lisina. Este resultado pode dever-se ao efeito reticulante e ao efeito plastificante da lisina na matriz. Uma vez que a lisina pode ter este duplo efeito, seria interessante produzir micropartículas com menores teores em lisina e estudar os perfis de libertação de 5_FU aos dois pH's.

Uma vez que o tempo de residência de uma substância no estômago varia entre 4 a 6 horas, não existe nenhuma matriz, estudada neste trabalho, que atinja o equilíbrio após esse intervalo de tempo. No entanto, existem micropartículas que retêm fármaco na sua matriz que pode ser depois libertado no intestino. dissoPor outro lado, e no caso concreto da Prednisolona, a sua baixa solubilidade, pode provocar a precipitação deste fármaco no tracto

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Conclusões

gastro-intestinal causando irritações, úlceras, etc. Assim, a encapsulação deste fármaco numa matriz polimérica não tóxica que liberte gradualmente o fármaco, ao mesmo tempo que este está a ser absorvido pelo organismo, pode evitar esse tipo de irritação diminuindo assim o seu grau de toxicidade.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Trabalho Futuro

5. Trabalho Futuro

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Trabalho Futuro

No futuro poderiam ser estudadas outras concentrações de lisina na matriz de FucoPol, visto que pode existir uma concentração óptima entre 0% e 50% do peso do polissacarídeo, para se conseguir uma libertação mais prolongada. Como em alguns ensaios de libertação nem todo o fármaco é libertado da matriz, seria interessante utilizar as micropartículas resultantes dos ensaios de libertação a pH=1,2 e submetê-las a ensaios de libertação a pH=6,8, simulando o tracto gastro-intestina. Além disso, os meios utilizados neste estudo não continham enzimas, que se encontram presentes no estômado e contribuem para a degradação do polímero e do fármaco, podendo alterar os resultados dos perfis de libertação.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - Trabalho Futuro

6. Bibliografia

- [1] B. Wang, T. Siahaan, R. Soltero, Drug Delivery: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [2] Coimbra, Patrícia Manuela Almeida, Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural, Coimbra: Dissertação para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2010.
- [3] L. Lachman, H. A. Lieberman e J. L. Kanig, Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
- [4] P.Venkatesan, R.Manavalan and K.Valliappan, "Microencapsulation: A vital technique in novel drug delivery system," *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, pp. 26-35, 2009.
- [5] D.E. Golan, A.H.Tashjian,Jr., E.J. Armstrong, A.W. Armstrong, Principles of Pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [6] P. Costa, J.M.S. Lobo, "Modeling and comparison of dissolution profiles," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, pp. 123-133, 2001.
- [7] G. Singhvi, M. Singh, "Review: In-vitro drug release characterization models," *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, pp. 77-84, 2011.
- [8] B. N. Estevinho, F. Rocha, L. Santos e A. Alves, "Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review," *Trends in Food Science & Technology*, pp. 1-18, 2013.
- [9] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie e X. Ma, "Microencapsulation using natural

polysaccharides for drug delivery and cell implantation," *Journal of Materials Chemistry*, pp. 3252-3267, 2006.

- [10] .Umer, H. Nigam, A.M. Tamboli, M.S.M. Nainar, "Microencapsulation: Process, Techniques and Applications," *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, pp. 474-481, 2011.
- [11] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel, "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview," *Food Research International*, pp. 1107-1121, 2007.
- [12] S.M. Jafari, E. Assadpoor, Y. He e B. Bhandari, "Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying," *Drying Technology*, pp. 816-835, 2008.
- [13] H. Azeredo, "Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos," *Alim. Nutr.*, pp. 89-97, 2005.
- [14] Donald L. Wise, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Marcel Dekker, Inc., 2000.
- [15] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie e X. Ma, "Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation," *Journal of Materials Chemistry*, pp. 3252-3267, 2006.
- [16] Natasha Yang, John Ashton, Stefan Kasapis, "The influence of chitosan on the structural properties of whey protein and wheat starch composite systems," *Food Chemistry*, vol. 179, pp. 60-67, 2015.
- [17] C. Damian, L.H. Beirão, A. Francisco, M.L.P. Espírito Santo, E. Teixeira, "Quitosana: Um amino polissacarídeo com características funcionais," *Alim. Nutr.*, pp. 195-205, 2005.
- [18] P.K. Dutta, J. Dutta e V.S. Tripathi, "Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications," *Journal of Scientific & Industrial Research*, pp. 20-31, 2004.

- [19] C.A.V. Torres, S. Antunes, A.R. Ricardo, C. Grandfils, V.D. Alves, F. Freitas, M.A.M. Reis, "Study of the interactive effect of temperature and pH on exopolysaccharide production by *Enterobacter* A47 using multivariate statistical analysis," *Bioresource Technology* 119, pp. 148-156, 2012.
- [20] M. Cruz, F. Freitas, C.A.V. Torres, M.A.M. Reis e V.D. Alves, "Influence of temperature on the rheological behavior of a new fucose-containing bacterial exopolysaccharide," *International Journal of Biological Macromolecules* 48, pp. 695-699, 2011.
- [21] V.Alves, "Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp.," *Carbohydrate Polymers*, pp. 758-756, 2010.
- [22] M. Cruz, F. Freitas, C.A.V. Torres, M.A.M. Reis e V.D. Alves, "Influence of temperature on the rheological behavior of a new fucose containing bacterial exopolysaccharide," *International Journal of Biological Macromolecules*, pp. 695-699, 2011.
- [23] P. Saari, K. Häkka, H. Heikkilä, J. Jumppanen, "A Novel Chromatographic Production Scale Separation Process for L-Fucose," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, pp. 2050-2064, 2009.
- [24] D. Lester, "Consider using Citric Acid," *Maximum Yield*, pp. 117-120, 2011.
- [25] S.A. Stone, P. Gosavi,T.J. Athauda, R.R. Ozer, "In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers," *Materials Letters*, 2013.
- [26] Kareem, S.O., Akpan, I. e Alebiowu, "Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste," *Malaysian Journal of Microbiology*, pp. 161-165, 2010.
- [27] P. Widsten, N. Dooley , R. Parr ,J.i Capricho , I. Suckling, "Citric acid crosslinking of paper products for improved high-humidity performance," *Carbohydrate Polymers*, pp. 998-1004, 2014.
- [28] Cui, Z., Beach, E.S., Anastas, "Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance," *Green Chemistry Letters and Reviews*, pp. 35-40, 2011.

- [29] "ChemSpider," [Online]. Available: www.chemspider.com.
- [30] Niels C. Danbolt, "Glutamate as a Neurotransmitter - An overview," *Prog. Neurobiol.*, pp. 1-105, 2001.
- [31] The Biology Project, "Amino Acids - Lysine," Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, University of Arizona, 2003. [Online]. Available: http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/Lysine.html.
- [32] Smriga, Ghosh, Mouneimne, Pellett e Scrimshaw, "'Lysine fortification reduces anxiety and lessens stress in family members in economically weak communities in Northwest Syria'," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 8285-8288, 2004.
- [33] Griffith RS, Norins AL, Kagan C., "'A multicentered study of lysine therapy in Herpes simplex infection'," *Dermatologia*, pp. 257-267, 1978.
- [34] Malet-Martino, M., Jolimaitre, P. and R., Martino, "The Prodrugs of 5-Fluorouracil," *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, vol.2, 2002.
- [35] H. Takeda, M. Haisa, Y. Naomoto, R. Kawashima, K. Satomoto, T. Yamatuji e N. Tanaka, "Effect of 5-Fluorouracil on cell cycle regulatory proteins in human cancer cell line," *Cancer Science*, vol. 90, pp. 677-684, 1999.
- [36] "Eukaryote Cell Divison: The Cell Cycle," Cliffs notes, [Online]. Available: <http://www.cliffsnotes.com/sciences/biology/plant-biology/cell-division/eukaryote-cell-divison-the-cell-cycle>. [Accessed 21 Dezembro 2014].
- [37] Xiaoyong Wang, Jun Lin, Xianming Zhang, Qin Liu, Qiang Xu, Ren-Xiang Tan, Zijian Guo, "5 - Fluorouracil-cisplatin adducts with potential antitumor activity," *Journal of Inorganic Biochemistry*, pp. 186-192, 2003.
- [38] M.R. El-Aassar, Elsayed E. Hafez, Nehal M. El-Deeb, Moustafa M.G. Fouda, "Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach," *International*

Journal of Biological Macromolecules, pp. 88-94, 2014.

- [39] A. Lamprecht, H. Yamamoto, H. Takeuchi e Y. Kawashima, "Observations in simultaneous microencapsulation of 5-fluorouracil and leucovorin for combined pH-dependent release," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, pp. 367-371, 2005.
- [40] C. Zinutti, F. Kedzierewicz, M. Hoffman, J.P. Benoit e P. Maincent, "Influence of the casting solvent on the physico-chemical properties of 5-fluorouracil loaded microspheres," *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 97-105, 1996.
- [41] M. Glavas Dodov, S. Calis, M.S. Crcarevska, N. Geskovski, V. Petrovska e K. Goracinova, "Wheat germ agglutinin-conjugated chitosan-Ca-alginate microparticles for local colon delivery of 5-FU: Development and in vitro characterization," *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 166-175, 2009.
- [42] . Malhotra, A. Kalia, S. Tomar, "Validated UV spectroscopic method for simultaneous estimation of Azithromycin and Prednisolone," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, pp. 299-302, 2011.
- [43] S.S. Chitlange, K.K. Chaturvedi and S.B. Wankhede, "Development and Validation of Spectrophotometric and HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Salbutamol Sulphate and Prednisolone in Tablet Dosage Form," *J Anal Bioanal Techniques*, 2011.
- [44] "Enfermedad inflamatoria intestinal: Enfermedad de Crohn," *North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*.
- [45] "Informação técnica farmacêutica - Prednisolona," DEG, 2007. [Online]. Available: <http://www.fagron.com.br/Literaturas/LITERATURAS%20FARMACEUTICAS/P/PREDNISOLONA.pdf>.
- [46] C.J., Tavares, Caracterização estrutural e mecânica de multicamadas de TiN/ZrN depositadas por PVD, 1997.

- [47] P. S. Gill, S. R. Sauerbrunn e M. Reading, "Modulated differential scanning calorimetry," *Journal of Thermal Analysis*, vol.40, pp. 931-939, 1993.
- [48] Reusch, William, "Infrared Spectroscopy," 2013. [Online]. Available: <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>.
- [49] J, Hanson, "Characteristic IR Absorption Frequencies of Organic Functional Groups," 2012. [Online]. Available: <http://www2.ups.edu/faculty/hanson/Spectroscopy/IR/IRfrequencies.html>.
- [50] L. Huang, W. Sui, Y. Wang, Q. Jiao, "Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil," *Carbohydrate Polymers*, pp. 168-173, 2009.
- [51] P. Zakeri-Milani, S.H. Nezhadi, M. Barzegar-Jalali, L. Mohammadi, A. Nokhodchi e H. Valizadeh, "Studies on Dissolution Enhancement of Prednisolone, a Poorly Water-Soluble Drug by Solid Dispersion Technique," *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, pp. 48-53, 2011.
- [52] Tegginamat, Mohamed S. Pendekal and Pramod K., "Development and characterization of chitosan-polycarbophil interpolyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application," *Pendekal and Tegginamat DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012.
- [53] Sigma, "Product Information - 5-Fluorouracil," [Online]. Available: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f6627pis.pdf.
- [54] V. Ramesh Babu, Malladi Sairam, Kallappa M. Hosamani e Tejrav M. Aminabhavi, "Development of 5-fluorouracil loaded poly(acrylamide-co-methylmethacrylate) novel core-shell microspheres: In vitro release studies," *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 55-62, 2006.
- [55] B Yerriswamy, C Lakshmi Narayana Reddy, C Venkata Prasad, M.C.S Subha, K Chowdoji Rao e G Venkatarreddy, "Controlled release studies of 5-Fluorouracil through poly (vinyl caprolactum-co-vinyl

acetate) microspheres," *Asian Journal of Pharmaceutics*, pp. 200-204, 2010.

- [56] F. Freitas, V.D. Alves, C.A.V. Torres, M. Cruz, I. Sousa, M.J. Melo, A.M. Ramos e M.A.M. Reis, "Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139," *Carbohydrate Polymers*, pp. 159-165, 2011.
- [57] S. Farquharson, A. Gift, C. Shende, F. Inscore, B. Ordway, C. Farquharson e J. Murren, "Molecules," *Surface-enhanced Raman Spectral Measurements of 5-Fluorouracil in Saliva*, pp. 2608-2627, 2008.
- [58] A. Parrill, "Amino Acid Structures," Department of Chemistry, Michigan State University, 1997. [Online]. Available: <http://www.cem.msu.edu/~cem252/sp97/ch24/ch24aa.html>.
- [59] "PubChem," [Online]. Available: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-lysine>. [Accessed 24 2 2015].
- [60] N.V.N. Jyothi, P.M. Prasanna, S.N. Sakarkar, K.S. Prabha, P.S. Ramaiah e G. Y Srawan, "Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency," *Journal of Microencapsulation*, p. 187-197, 2010.

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - 7. Anexos

7. Anexos

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - 7. Anexos

Anexo 1 – Difraccção de raios-X do ácido glutâmico

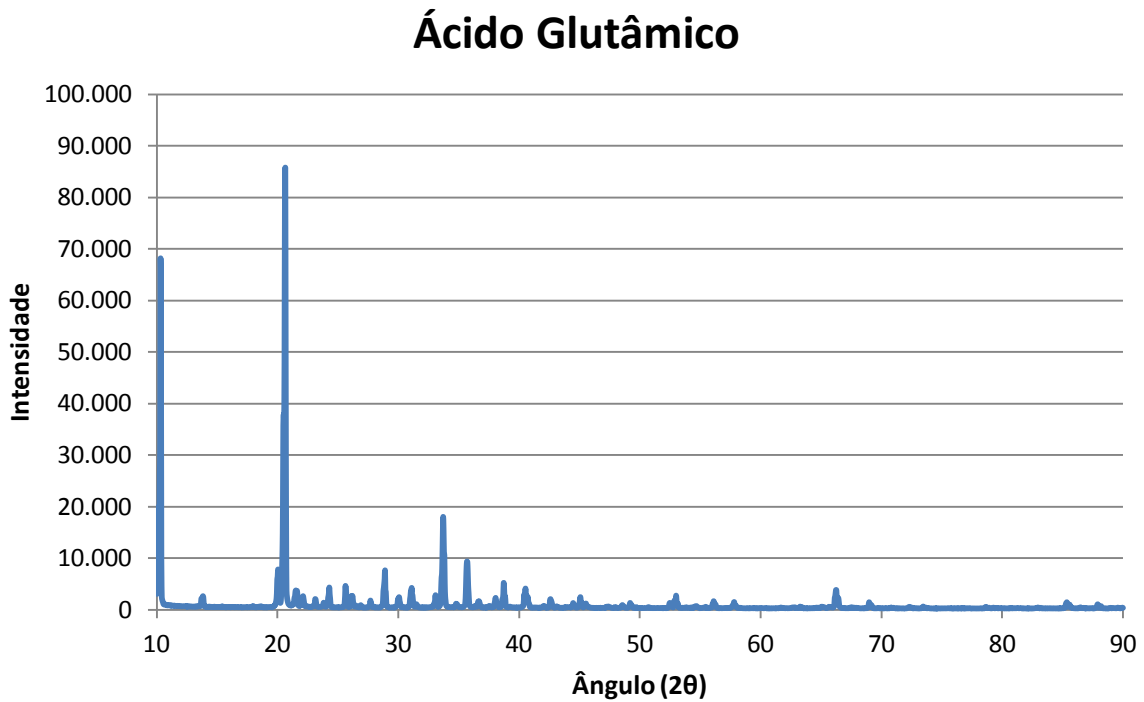


Figura 0.1 - Espectro XRD do ácido glutâmico

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - 7. Anexos

Anexo 2 – Calorimetria Diferencial de Varrimento do quitosano

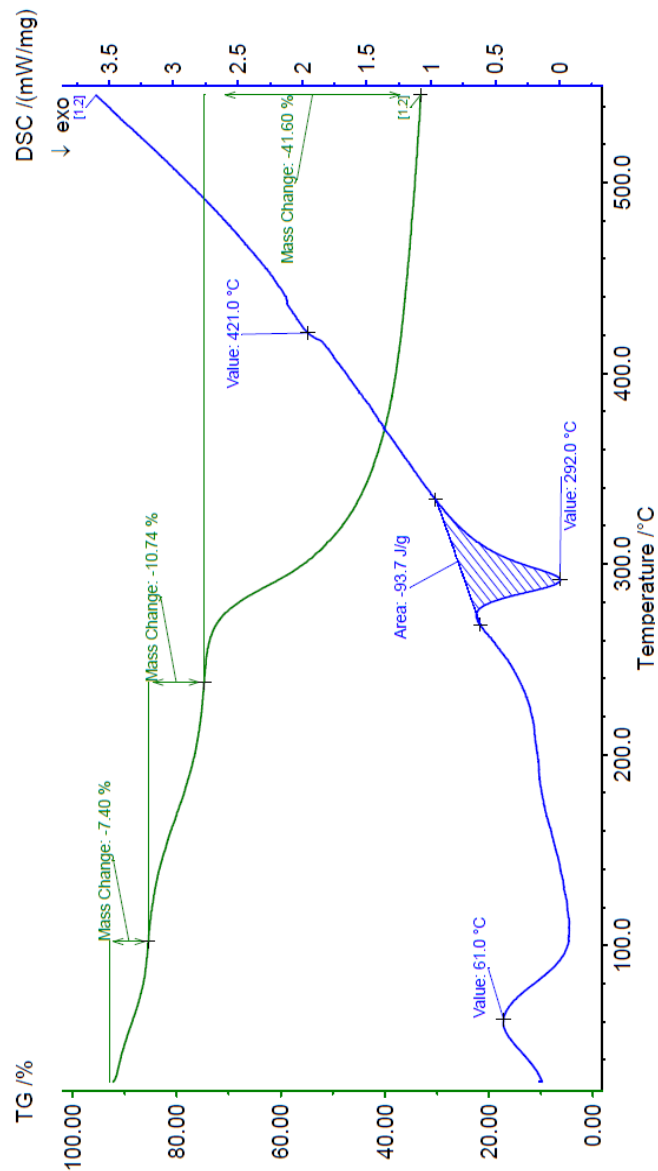


Figura 0.2 - DSC do quitosano

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - 7. Anexos

Anexo 3 – Difraccção de raios-X da Prednisolona

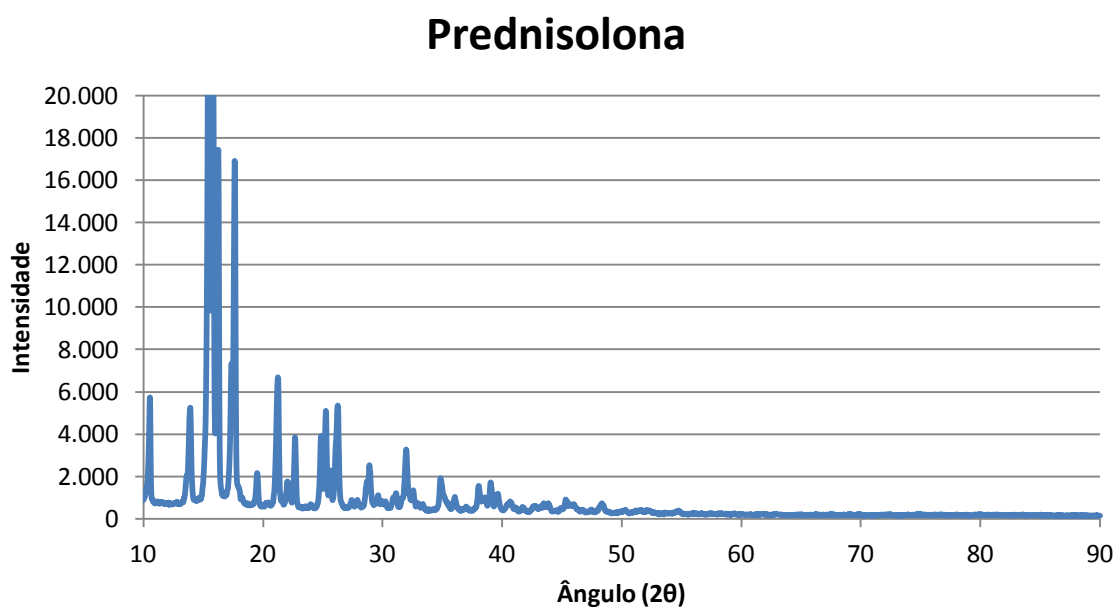


Figura 0.3 - Espectro XRD da Prednisolona

" Preparação e caracterização de micropartículas de polissacarídeos produzidas por secagem por atomização para libertação controlada de fármacos" - 7. Anexos

Anexo 3 – Difraccção de raios-X da Lisina

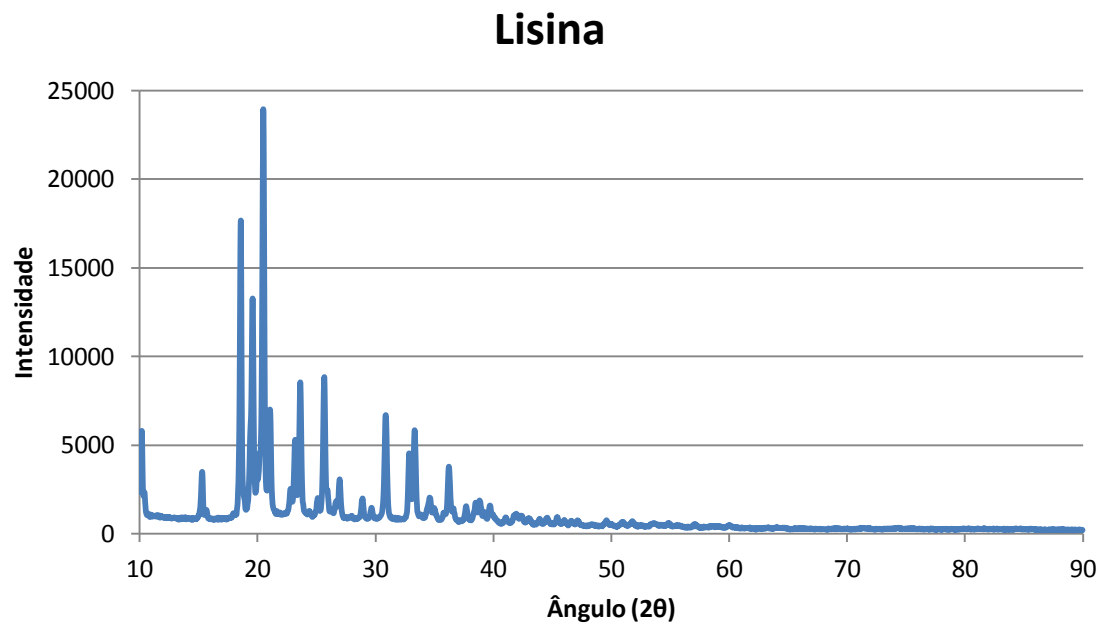


Figura 0.4 - Espectro XRD da Lisina